

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>C12N 15/86, 15/34, 5/10, 7/04, C07K 14/075</b>	<b>A1</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 96/22378</b> (43) Date de publication internationale: 25 juillet 1996 (25.07.96)
--	-----------	--

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00088

(22) Date de dépôt international: 19 janvier 1996 (19.01.96)

(30) Données relatives à la priorité:

95/00747	20 janvier 1995 (20.01.95)	FR
95/06532	1er juin 1995 (01.06.95)	FR
95/10541	8 septembre 1995 (08.09.95)	FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DEDIEU, Jean-François [FR/FR]; 84, quai de Jemmapes, F-75010 Paris (FR). LATTA, Martine [FR/FR]; 141, rue de Paris, F-94220 Charenton-le-Pont (FR). ORSINI, Cécile [FR/FR]; 19, rue de la Voûte, F-75012 Paris (FR). PERRICAUDET, Michel [FR/FR]; 31, rue de Chartres, F-28320 Ecrosnes (FR). VIGNE, Emmanuelle [FR/FR]; 60, rue Jean-Le-Galleu, F-94200 Ivry-sur-Seine (FR). YEH, Patrice [FR/FR]; 11 bis, rue Lacépède, F-75005 Paris (FR).

(74) Mandataire: LE COUPANEC, Pascale; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR).

(81) Etats désignés: AL, AM, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KG, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN, brevet ARIPO (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), brevet eurasien (AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée

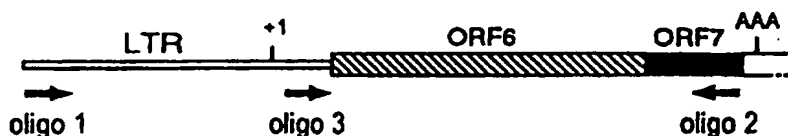
*Avec rapport de recherche internationale.**Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.***BEST AVAILABLE COPY**

(54) Title: CELLS FOR THE PRODUCTION OF RECOMBINANT ADENOVIRUSES

(54) Titre: CELLULES POUR LA PRODUCTION D'ADENOVIRUS RECOMBINANTS

(57) Abstract

The invention relates to cells usable for the production of defective adenoviruses comprising, inserted into their genome, a portion of the region E4 of an adenovirus genome carrying the reading phase ORF6 under the control of a functional promoter.



The invention relates to cells usable for the production of defective adenoviruses comprising, inserted into their genome, a portion of the region E4 of an adenovirus genome carrying the reading phase ORF6 under the control of a functional promoter.

(57) Abrégé

L'invention concerne des cellules utilisables pour la production d'adénovirus défectifs comprenant, insérée dans leur génome, une partie de la région E4 d'un génome d'adénovirus portant la phase de lecture ORF6 sous contrôle d'un promoteur fonctionnel.

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

## CELLULES POUR LA PRODUCTION D'ADENOVIRUS RECOMBINANTS

La présente invention concerne de nouvelles lignées cellulaires utilisables pour la production d'adénovirus recombinants défectifs. Elle concerne également les préparations virales purifiées produites dans ces lignées, ainsi que les plasmides permettant leur construction. Plus particulièrement, les nouvelles lignées cellulaires selon l'invention permettent la transcomplémentation de la région E4 et une production clonale avec des titres élevés d'adénovirus recombinants défectifs notamment pour tout ou partie de la région E4.

Les adénovirus présentent certaines propriétés particulièrement avantageuses pour une utilisation comme vecteur de transfert de gènes en thérapie génique. Notamment, ils ont un spectre d'hôte assez large, sont capables d'infecter des cellules quiescentes, ne s'intègrent pas au génome de la cellule infectée, et n'ont pas été associés à ce jour à des pathologies importantes chez l'homme. Les adénovirus ont ainsi été utilisés pour transférer des gènes d'intérêt dans le muscle (Ragot et al., Nature 361 (1993) 647), le foie (Jaffé et al., Nature genetics 1 (1992) 372), le système nerveux (Akli et al., Nature genetics 3 (1993) 224), etc.

Les adénovirus sont des virus à ADN double brin linéaire d'une taille de 36 kb environ. Leur génome comprend notamment une séquence inversée répétée (ITR) à chaque extrémité, une séquence d'encapsidation (Psi), des gènes précoces et des gènes tardifs (Cf figure 1). Les principaux gènes précoces sont contenus dans les régions E1, E2, E3 et E4. Parmi ceux-ci, les gènes contenus dans la région E1 notamment sont nécessaires à la propagation virale. Les principaux gènes tardifs sont contenus dans les régions L1 à L5. Le génome de l'adénovirus Ad5 a été entièrement séquencé et est accessible sur base de données (voir notamment Genebank M73260). De même des parties, voire la totalité d'autres génomes adénoviraux (Ad2, Ad7, Ad12, etc) ont également été séquencées.

Pour leur utilisation en thérapie génique, différents vecteurs dérivés des adénovirus ont été préparés, incorporant différents gènes ( $\beta$ -gal, OTC,  $\alpha$ -1AT, cytokines, etc). Dans chacune de ces constructions, l'adénovirus a été modifié de manière à le rendre incapable de répliquer dans la cellule infectée. Ainsi, les constructions décrites dans l'art antérieur sont des adénovirus délétés de la région E1, essentielle à la répllication virale, au niveau de laquelle sont insérées les séquences d'ADN hétérologue (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195; Gosh-Choudhury et al., Gene 50 (1986) 161). Ces adénovirus sont produits dans une lignée de complémentation (lignée 293) dans laquelle une partie du génome de l'adénovirus

a été intégrée. Plus précisément, la lignée 293 contient l'extrémité gauche (environ 11-12%) du génome de l'adénovirus sérotype 5 (Ad5), comprenant l'ITR gauche, la région d'encapsidation, la région E1, incluant E1a, E1b, la région codant pour la protéine pIX et une partie de la région codant pour la protéine pIVa2. Cette lignée est capable de trans-  
5 complémenter des adénovirus recombinants défectifs pour la région E1, c'est-à-dire dépourvus de tout ou partie de la région E1, et de produire des stocks viraux ayant des titres élevés. Cependant, les vecteurs déficients pour la région E1 (vecteurs E1<sup>-</sup>, dits de première génération) présentent certains inconvénients pour une utilisation thérapeutique. En particulier, ils pourraient ne pas être totalement défectifs pour la réplication in vivo, en  
10 raison notamment de l'existence de certaines fonctions cellulaires transcomplémentantes. Ainsi, une activité de transcomplémentation de E1 a été mise en évidence dans les cellules de carcinome embryonnaire F9 (Imperiale et al., Mol. Cell. Biol. 4, 1984, 867-874). Une activité de même type, régulée par l'interleukine-6, a également été mise en évidence (Spergel et al., J. Virol. 66, 1992, 1021-1030). D'autres inconvénients liés à ces vecteurs  
15 sont la présence de nombreux gènes viraux, susceptibles d'être exprimés in vivo après transfert de gènes, et d'induire une réponse immunitaire et/ou inflammatoire.

Pour pallier à ces inconvénients, il a été proposé de créer d'autres délétions ou modifications dans le génome de l'adénovirus. Ainsi, une mutation ponctuelle thermosensible a été introduite dans le mutant ts125, permettant d'inactiver la protéine de  
20 liaison à l'ADN (DBP) de 72kDa (Van der Vliet et Süssbach, Virology 67, 1975, 415-426). Ces vecteurs peuvent également être produits avec des titres élevés dans les cellules de la lignée 293 à la température permissive (32°C). Toutefois, ce type de vecteur présente aussi un certain nombre d'inconvénients tels qu'une surexpression in vivo de la région E4; la présence d'une mutation ponctuelle, donc sujette à réversion, un risque d'activité partielle à  
25 37°C, etc.

Une autre approche pour remédier à ces problèmes réside dans la délétion d'une autre région essentielle à la réplication et/ou à la propagation virale. A cet égard, la demanderesse s'est intéressée plus particulièrement à la région E4. La région E4 est en effet impliquée dans la régulation de l'expression des gènes tardifs, dans la stabilité des ARN  
30 nucléaires tardifs, dans l'extinction de l'expression des protéines de la cellule hôte et dans l'efficacité de la réplication de l'ADN viral. Des vecteurs adénoviraux dans lesquels les régions E1 et E4 sont délétées possèdent donc un bruit de fond de transcription et une expression de gènes viraux très réduits (voir notamment la demande PCT/FR94/00851). Toutefois, la construction et l'exploitation industrielle et thérapeutique de tels vecteurs

implique la mise à disposition d'un système efficace de transcomplémentation de ces deux fonctions pour la production des stocks viraux.

La présente invention apporte une solution à ce problème. La présente invention fournit en effet des lignées cellulaires permettant la transcomplémentation de la région E4 et une production clonale et avec des titres élevés d'adénovirus recombinants défectifs pour cette région. Les lignées selon l'invention sont avantageusement capables de transcomplémenter les deux fonctions E1 et E4, et permettent donc de produire des virus déficients pour ces deux fonctions. La présente invention fournit également des plasmides permettant la construction de ces lignées; un procédé de préparation d'adénovirus recombinants défectifs et des stocks viraux purifiés. Plus particulièrement, la demanderesse a maintenant montré que des lignées de production capables de transcomplémenter efficacement la région E4 sont obtenues par introduction d'une partie seulement de la région E4. Ainsi, des lignées ayant des propriétés particulièrement avantageuses sont obtenues lorsque seulement une unité fonctionnelle réduite de la région E4, correspondant à la phase de lecture ORF6 ou aux phases de lecture ORF6/7, sont présentes.

Un premier objet de l'invention réside donc dans une cellule utilisable pour la production d'adénovirus recombinants défectifs comprenant, insérée dans son génome, une partie de la région E4 d'un génome d'adénovirus comportant la phase de lecture ORF6 sous contrôle d'un promoteur fonctionnel. Selon un mode préféré, les cellules de l'invention comprennent une partie de la région E4 d'un génome d'adénovirus comportant les phases de lecture ORF6 et ORF6/7 sous contrôle d'un promoteur fonctionnel.

Comme indiqué ci-avant, les lignées cellulaires selon la présente invention présentent des propriétés particulièrement avantageuses : Elles permettent tout d'abord la transcomplémentation des fonctions E1 et E4. Mais, de manière particulièrement avantageuse, elles sont capables d'induire la formation de plages de virus déficients dans ces fonctions, ce qui est indispensable au clonage des virus recombinants, puis à leur amplification et à leur purification. A cet égard, la demanderesse a en effet montré que des lignées possédant l'ensemble de la région E4 ou des unités fonctionnelles plus grandes, incluant par exemple la phase de lecture ORF4, sont incapables de former des plages de virus déficients pour la région E4. L'identification d'unités fonctionnelles spécifiques de la région E4 permet la réalisation d'un système très efficace de transcomplémentation et de production de virus défectifs pour les fonctions E1 et E4. D'autres avantages des lignées selon l'invention sont notamment leur aptitude pour l'amplification en milieu liquide de tels

virus déficients pour les régions E1 et E4, les titres élevés de tels virus qu'elles produisent, et l'absence de production de particule virale répliquante.

La région E4 du génome adénoviral est constituée de 7 phases ouvertes de lecture, désignées ORF1, ORF2, ORF3, ORF4, ORF3/4, ORF6 et ORF6/7 (figures 2 et 3). Comme  
5 indiqué ci-avant, les cellules de l'invention sont caractérisées particulièrement par la présence d'une partie seulement de cette région, comprenant la phase de lecture ORF6 éventuellement associée à la phase de lecture ORF6/7. Il est particulièrement important que la partie de la région E4 présente dans les cellules de l'invention ne contiennent pas la phase de lecture ORF4 fonctionnelle. Avantagusement, la région E4 présente dans les cellules de  
10 l'invention ne contient pas les phases de lecture ORF1-ORF4 fonctionnelles. De manière particulièrement préférée, la région E4 présente dans les cellules de l'invention est déletée d'une partie au moins des phases de lecture ORF1-ORF4. Ces différentes parties de la région E4 peuvent être obtenues par coupures enzymatiques ou modifiées selon les méthodes connues de l'homme du métier. Selon un mode de réalisation préféré, les lignées  
15 cellulaires de l'invention comprennent un fragment inséré contenant moins de 2 kb de la région E4 d'un génome d'adénovirus contenant la totalité des phases de lecture ORF6 et éventuellement ORF6/7. A titre d'exemples préférés, la phase de lecture ORF6 peut être isolée de la région E4 sous forme d'un fragment BglII-PvuII, correspondant aux nucléotides 34115-33126, et les phases de lecture ORF6-ORF6/7 peuvent être isolées de la région E4  
20 sous forme d'un fragment BglII-BglII correspondant aux nucléotides 34115-32490 du génome de l'Ad5. Selon un mode particulier de l'invention, la phase de lecture ORF6 est fusionnée en phase traductionnelle avec le domaine d'un récepteur nucléaire qui est responsable de la reconnaissance de son ligand spécifique. Le domaine de fixation à l'hormone (HBD: Hormone Binding Domain) du récepteur aux glucocorticoïdes (GCR :  
25 Hollenberg et al. 1985, Nature, 318, 635-341) est avantagusement choisi car il permet de retenir, dans le compartiment cytoplasmique de la cellule, la protéine de fusion en absence d'hormone (T. MATTIONI et al., 1994, Methods in Cell Biology, Chapter 16, 335-352) grâce à l'interaction stable du HBD (GCR) avec la protéine cytoplasmique hsp90 et d'autres cofacteurs (S.P. BOHEN et al., 1995, Science, 268, 1303-1304). La présence de l'hormone  
30 provoque alors la translocation de la protéine de fusion du cytoplasme dans le noyau, ce qui permet la fonctionnalité de l'activité ORF6 de E4 dans le compartiment nucléaire. Il est également possible que l'ajout d'hormone provoque un "démasquage" des domaines fonctionnels de l'activité ORF6 par un changement transconformationnel de la protéine hybride.

A cet égard, un mode de réalisation particulièrement préféré de l'invention est constitué par une cellule comprenant, inséré dans son génome, un fragment BglII-BglII correspondant aux nucléotides 34115-32490 du génome de l'Ad5. Ce fragment est présent notamment dans le plasmide pORF6Gen décrit dans les exemples, utilisé pour la construction de la lignée cellulaire clone#2. Un autre mode de réalisation particulièrement préféré de l'invention est constitué par une cellule comprenant, inséré dans son génome, un fragment BglII-PvuII correspondant aux nucléotides 34115-33126 du génome de l'Ad5. Dans un autre mode de l'invention, la région ORF6 au moins, est couplée au HBD du GCR, soit à son extrémité C-terminale (fusion GCR-ORF6), soit à son extrémité N-terminale (fusion ORF6-GCR). Dans le cas de la fusion C-terminale, la séquence du virus codant pour ORF6 et ORF7 est avantageusement insérée en phase traductionnelle en aval de la séquence spécifiant le HBD du GCR. Dans cette réalisation particulière, l'expression du gène chimérique génère alors un ARN primaire dont le produit de traduction est la protéine GCR-ORF6 (SEQ ID N°7). L'épissage alternatif de ce transcript génère quant à lui un ARN messager qui code pour la protéine fusion GCR-ORF6/7 (cf. Exemple 1.5).

La partie de la région E4 présente dans les cellules selon l'invention peut être issue d'adénovirus de différentes origines ou sérotypes. Il existe en effet différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, mais qui présentent une organisation génétique comparable. Plus particulièrement, la région E4 présente dans les cellules selon l'invention peut être issue d'un adénovirus d'origine humaine ou animale.

Concernant les adénovirus d'origine humaine, on peut citer préférentiellement ceux classés dans le groupe C. Plus préférentiellement encore, parmi les différents sérotypes d'adénovirus humain, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5). Parmi les différents adénovirus d'origine animale, on préfère utiliser dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine canine, et notamment toutes les souches des adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. D'autres adénovirus d'origine animale sont cités notamment dans la demande WO94/26914 incorporée à la présente par référence.

Dans un mode préféré de mise en oeuvre de l'invention, la partie de la région E4 est issue d'un génome d'adénovirus humain du groupe C. De manière plus préférentielle, elle est issue du génome d'un adénovirus Ad2 ou Ad5.

Comme indiqué précédemment, la partie de la région E4 présente dans les cellules de l'invention est placée sous le contrôle d'un promoteur fonctionnel dans lesdites cellules.

Avantageusement, il s'agit d'un promoteur inductible, permettant de contrôler les niveaux et/ou les périodes d'expression de ces gènes. De manière particulièrement avantageuse, il s'agit du promoteur du LTR de MMTV (Pharmacia), qui est induit par la dexaméthasone ou d'un promoteur régulé par la tétracycline (WO94/29442; WO94/04672). Il est entendu que  
5 d'autres promoteurs peuvent être utilisés, et notamment des variants du LTR de MMTV portant par exemple des régions hétérologues de régulation (régions "enhancer" notamment).

Dans un mode de réalisation particulier, l'expression des gènes hybrides est sous le contrôle de promoteurs régulés afin d'éviter une accumulation constitutive de la protéine de  
10 fusion dans le cytoplasme, ou pour minimiser la "fuite" vers le compartiment nucléaire et une certaine cytotoxicité. Dans un mode de réalisation encore plus particulier, le gène chimérique est sous le contrôle d'un promoteur inductible qui répond aux glucocorticoides tel que le promoteur GRE5 (S. Mader and J. White, 1993, PNAS, 90, 5603-5607; cf. Exemple 1.5).

15 Les cellules selon l'invention peuvent être préparées à partir de différentes cellules pharmaceutiquement utilisables, c'est-à-dire cultivables dans des conditions industriellement acceptables et n'ayant pas de caractère pathogène reconnu. Il peut s'agir de lignées cellulaires établies ou de cultures primaires et notamment de cellules de rétine embryonnaire humaine. Il s'agit avantageusement de cellules d'origine humaine, infectables par un  
20 adénovirus. A cet égard, on peut citer les cellules KB, Hela, 293, Vero, gmDBP6, etc.

Les cellules de la lignée KB sont issues d'un carcinome épidermique humain. Elles sont accessibles à l'ATCC (ref. CCL17) ainsi que les conditions permettant leur culture. La lignée de cellules humaines Hela est issue d'un carcinome de l'épithélium humain. Elle est également accessible à l'ATCC (ref. CCL2) ainsi que les conditions permettant sa culture.  
25 Les cellules de la lignée 293 sont des cellules de rein embryonnaire humain (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59). Cette lignée contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome de l'adénovirus humain Ad5 (12 %). La lignée de cellules gm DBP6 (Brough et al., Virology 190 (1992) 624) est constituée de cellules Hela portant le gène E2 d'adénovirus sous le contrôle du LTR de MMTV.

30 Il peut s'agir également de cellules d'origine canine (BHK, MDCK, etc). A cet égard, les cellules de la lignée canines MDCK sont préférées. Les conditions de culture des cellules MDCK ont été décrites notamment par Macatney et al., Science 44 (1988) 9.



Les lignées cellulaires selon l'invention peuvent être construites de différentes manières. De façon générale, elles sont préparées par transformation d'une culture cellulaire avec un plasmide portant le fragment sélectionné de la région E4 sous contrôle d'un promoteur fonctionnel. La transfection des cellules peut être réalisée par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment en présence de phosphate de calcium, par électroporation, etc. Selon un mode particulier de réalisation, le plasmide utilisé porte également un gène marqueur permettant d'identifier et de sélectionner les cellules transformées. Il peut s'agir notamment de tout gène de résistance à un antibiotique (généticine, hygromycine, etc). Le gène marqueur peut également être porté par une construction séparée, co-transfectée avec le plasmide. Après transfection et sélection pour le gène marqueur, les cellules obtenues peuvent être sélectionnées pour leur capacité à transcomplémenter des adénovirus dépourvus de la région E4. Pour cela, différents adénovirus mutants défectifs pour différentes parties de la région E4 peuvent être utilisés, tels que notamment les adénovirus Ad2dl808 (Weinberg et Ketner, J. Virol. 57 (1986) 833), Ad5dl1004, dl1007 ou dl1014 (Bridge et Ketner, J. Virol. 63 (1989) 631), dl1011 (Bridge et al., Virology 193 (1993) 794), comme indiqué dans les exemples.

Avantageusement, les cellules selon l'invention sont également capables de transcomplémenter pour la région E1. Celles-ci peuvent être construites comme décrit ci-avant à partir de cellules qui transcomplémentent déjà la région E1 (exemple : cellules 293), ou par introduction séquentielle d'une construction apportant la région E1 et d'une construction apportant la partie de la région E4 selon l'invention, par exemple dans des rétinoblastes d'origine humaine.

Selon un mode particulièrement préféré, les cellules selon l'invention dérivent de la lignée cellulaire 293. A cet égard, des résultats particulièrement avantageux ont été obtenus avec des cellules de la lignée 293 transformées par le plasmide pORF6Gen ou le plasmide pGG0 qui code pour les protéines HBD-ORF6 et HBD-ORF6/7.

La présente invention décrit également la construction de plasmides comprenant une partie de la région E4 d'un génome d'adénovirus portant la phase de lecture ORF6 ou ORF6 et ORF6/7 sous contrôle d'un promoteur inductible (voir notamment les plasmides pORF6Gen et pGG0). Ces plasmides peuvent être utilisés directement pour transfecter une population cellulaire choisie, puis, par sélection, pour l'identification de cellules ayant acquis stablement la fonction E4.

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation des cellules décrites ci-avant pour la production d'adénovirus recombinants défectifs au moins pour la région E4. L'invention fournit en effet un procédé de production d'adénovirus recombinants défectifs au moins pour la région E4 particulièrement avantageux, mettant en oeuvre les cellules ci-avant. Selon ce procédé, on transforme une culture de cellules telles que décrites ci-avant avec un ou plusieurs plasmides apportant les différentes régions du génome dudit adénovirus recombinant défectif puis on récolte les virus produits. Ce procédé est particulièrement avantageux pour la production d'adénovirus possédant des régions E1 et E4 non fonctionnelles. Il s'agit notamment de vecteurs dans lesquels les régions E1 et E4 ont été inactivées ou rendues non fonctionnelles par délétion totale ou partielle. De telles modifications peuvent être obtenues in vitro (sur de l'ADN isolé) ou in situ, par exemple, au moyen des techniques du génie génétique, ou encore par traitement au moyen d'agents mutagènes. La ou lesdites modifications génétiques peuvent être localisées dans une partie codante de la région, ou en dehors d'une région codante, et par exemple dans les régions responsables de l'expression et/ou de la régulation transcriptionnelle desdits gènes. La délétion peut être effectuée par digestion au moyen d'enzymes de restriction appropriées, puis ligature, selon les techniques classiques de biologie moléculaire.

Selon un mode particulièrement avantageux, le procédé de l'invention est utilisé pour la production d'adénovirus recombinants dans lesquels la région E1 est inactivée par délétion d'un fragment PvuII-BglIII allant du nucléotide 454 au nucléotide 3328, sur la séquence de l'adénovirus Ad5. Cette séquence est accessible dans la littérature et également sur base de données (voir notamment Genbank n° M73260). Dans un autre mode de réalisation préféré, la région E1 est inactivée par délétion d'un fragment HinfII-Sau3A allant du nucléotide 382 au nucléotide 3446. Dans un mode particulier, le procédé permet la production de vecteurs comprenant une délétion de la totalité de la région E4. Ceci peut être réalisé par excision d'un fragment MaeII-MscI correspondant aux nucléotides 35835-32720. Les lignées cellulaires selon l'invention sont en effet capables de transcomplémenter et d'amplifier des adénovirus portant tout type de délétion ou inactivation de la région E4. Dans un autre mode particulier, seule une partie fonctionnelle de E4 est délétée. Cette partie comprend au moins les phases ORF3 et ORF6. A titre d'exemple, ces phases codantes peuvent être délétées du génome sous forme de fragments PvuII-AluI et BglIII-PvuII respectivement, correspondant aux nucléotides 34801-34329 et 34115-33126 respectivement. Les délétions de la région E4 du virus Ad2 dl808 ou des virus Ad5 dl1004, Ad5 dl1007, Ad5 dl1011 ou Ad5 dl1014 peuvent également être utilisées dans le cadre de l'invention. A cet égard, les cellules de l'invention sont particulièrement avantageuses pour

la production de virus comprenant une région E1 inactive et une délétion dans la région E4 du type de celle présente dans le génome de Ad5 dl1014, c'est-à-dire de virus E4<sup>-</sup> conservant la phase de lecture ORF4.

La présente invention décrit donc également des adénovirus recombinants défectifs dont le génome comprend une délétion dans la région E1 et une délétion dans la région E4. Plus particulièrement, elle décrit des adénovirus recombinants défectifs dont le génome comprend une délétion dans la région E1 et une délétion dans la région E4 correspondant au moins aux phases de lectures ORF3 et ORF6. Ainsi, les adénovirus selon l'invention comportent préférentiellement les délétions suivantes affectant tout ou partie des régions E1 et E4 :

- Adénovirus  $\Delta E1, ORF3^{-}, ORF6^{-}$  : délétion de tout ou partie de la région E1 et des nucléotides 34801-34329 et 34115-33126 de la région E4;

- Adénovirus  $\Delta E1, \Delta E4, ORF1^{+}$  : délétion de tout ou partie de la région E1 et de la région E4 à l'exception de la phase de lecture ORF1. Cette délétion dans la région E4 couvre préférentiellement les nucléotides 33093 (SmaI) à 35053 (AccIII). Elle est obtenue par exemple à partir du mutant Ad5 dl1004. D'autres délétions peuvent être utilisées pour la réalisation d'adénovirus  $\Delta E1, \Delta E4, ORF1^{+}$  de l'invention, sur la base des informations données dans le présente demande et de la séquence nucléotidique SEQ ID n° 4. Cette séquence double brin représente la partie droite du génome adénoviral, incluant la région E4 et l'ITR droite du nucléotide 32749 (1 sur SEQ ID n°4) à 35935 (3186 sur SEQ ID n°4). Il s'agit d'une séquence purement illustrative et d'autres séquences publiées sont également utilisables. Les différentes phases de lecture de la région E4 sont représentées, notamment ORF7, ORF6, ORF4, ORF3, ORF2 et ORF1. Un adénovirus  $\Delta E1, \Delta E4, ORF1^{+}$  de l'invention comprend avantageusement une délétion dans la région E1 et une délétion d'un fragment dont l'extrémité 5' est comprise dans la phase de lecture ORF7 et dont l'extrémité 3' est située dans la phase de lecture ORF2. Encore plus préférentiellement, la délétion concerne un fragment dont l'extrémité 5' est comprise entre les nucléotides 32920 à 33190 du génome de l'adénovirus et dont l'extrémité 3' est comprise entre les nucléotides 34710 à 35090 du génome adénoviral. Cette délétion correspond environ aux nucléotides 170 à 440 (extrémité 5') et 1960 à 2340 (extrémité 3') sur la séquence SEQ ID n°4.

- Adénovirus  $\Delta E1, \Delta E4, ORF4^{+}$  : délétion de tout ou partie de la région E1 et de la région E4 à l'exception de la phase de lecture ORF4. Un adénovirus  $\Delta E1, \Delta E4, ORF4^{+}$  de l'invention comprend avantageusement une délétion dans la région E1, une délétion d'un

fragment dont l'extrémité 5' est comprise dans la phase de lecture ORF7 et dont l'extrémité 3' est située dans la phase de lecture ORF6 (à l'exception de la partie chevauchant la phase de lecture ORF4), et une délétion d'un fragment dont l'extrémité 5' est comprise dans la phase de lecture ORF3 et dont l'extrémité 3' est située dans la phase de lecture ORF1 ou  
5 dans la région promotrice de E4. Plus préférentiellement, ces adénovirus selon l'invention comprennent :

(i) une délétion de tout ou partie de E1,

(ii) une délétion d'un fragment dont l'extrémité 5' est comprise entre les nucléotides 32920 à 33190 du génome de l'adénovirus et dont l'extrémité 3' est comprise entre les  
10 nucléotides 33200 à 34000 du génome adénoviral, et,

(iii) une délétion d'un fragment dont l'extrémité 5' est comprise entre les nucléotides 34360 à 34700 du génome de l'adénovirus et dont l'extrémité 3' est comprise entre les nucléotides 35150 à 35530 du génome adénoviral.

Les positions correspondantes de la délétion (ii) sur la séquence SEQ ID n° 4 sont  
15 180 à 445 (extrémité 5') et 450 à 1250 (extrémité 3'). Les positions correspondantes de la délétion (iii) sur la séquence SEQ ID n° 4 sont 1610 à 1950 (extrémité 5') et 2410 à 2870 (extrémité 3').

Ces délétions dans la région E4 couvrent préférentiellement les nucléotides 33093(SmaI)-33695 et 34634 (SspI)-35355(SmaI). Elles peuvent être obtenues par  
20 exemple à partir du mutant Ad5 dl1014.

- Adénovirus  $\Delta E1, \Delta E4$  : délétion de tout ou partie de la région E1 et des nucléotides 32720-35835, ou 33466-35355 (cette délétion peut être obtenue par exemple à partir du mutant Ad5 dl1007) ou 33093-35355 (cette délétion peut être obtenue par exemple à partir du mutant Ad5 dl1011). Ces 3 délétions couvrent la totalité de la région E4.

25 Comme indiqué ci-avant, la délétion dans la région E1 couvre avantageusement tout ou partie des régions E1A et E1B. Cette délétion doit être suffisante pour rendre le virus incapable de répllication autonome dans une cellule. La partie de la région E1 délétée dans les adénovirus selon l'invention couvre avantageusement les nucléotides 454-3328 ou 382-3446.

Les positions données ci-dessus font référence à la séquence de l'adénovirus Ad5 sauvage telle que publiée et accessible sur base de donnée. Bien que des variations mineures puissent exister entre les différents sérotypes d'adénovirus, ces positions sont généralement applicables à la construction d'adénovirus recombinants selon l'invention à partir de tout sérotype, et notamment des adénovirus Ad2 et Ad7.

Par ailleurs, les adénovirus de l'invention peuvent posséder d'autres altérations au niveau de leur génome. En particulier, d'autres région peuvent être délétées pour augmenter la capacité du virus et réduire ces effets secondaires liés à l'expression de gènes viraux. Ainsi, tout ou partie de la région E3 ou IVa2 notamment peut être délétée. Concernant la région E3, il peut cependant être particulièrement avantageux de conserver la partie codant pour la protéine gp19K. Cette protéine permet en effet d'éviter que le vecteur adénovirus fasse l'objet d'une réaction immunitaire qui (i) limiterait son action et (ii) pourrait avoir des effets secondaires indésirables. Selon un mode particulier, la région E3 est délétée et la séquence codant pour la protéine gp19k est réintroduite sous contrôle d'un promoteur hétérologue.

Les adénovirus recombinants selon l'invention possèdent des propriétés particulièrement attractives pour une utilisation en thérapie génique. Ces vecteurs combinent en effet des propriétés d'infection, de sécurité (les risques de réaction immunitaire et/ou inflammatoire sont fortement réduits) et de capacité de transfert de gènes très élevées. De plus, les lignées de l'invention permettent la production de stocks viraux totalement dépourvus de particules répliquantes contaminantes (RCA). Ainsi, les résultats présentés montrent la construction et la production par les lignées de l'invention d'adénovirus défectifs pour les régions E1 et E4, dépourvus de RCA. En particulier, l'apparition de particules contaminantes répliquantes E4+ lors de la production des virus  $\Delta E1, \Delta E4, ORF1^+$ ,  $\Delta E1, \Delta E4, ORF4^+$  ou  $\Delta E1, \Delta E4$  selon l'invention n'est pas possible avec les lignées de l'invention puisque (i) ces virus ne contiennent pas de séquences recouvrantes de part et d'autres de la région intégrée dans le génome de la cellule (Figure 3) et (ii) un événement de recombinaison homologue simple entre les régions cellulaires et virales générerait un virus non viable dépourvu d'ITR droite. Un autre avantage des virus selon l'invention réside dans leur capacité de clonage accrue, permettant l'insertion de transgènes de grande taille (supérieure à 10kb). Ceci permet en particulier l'utilisation de séquences régulatrices de la transcription permettant d'améliorer l'efficacité, la régulation et la durée d'expression. Ceci permet en outre d'utiliser des doses plus faibles de virus et d'obtenir un effet thérapeutique comparable avec des effets secondaires cytopathiques très réduits.

Comme indique avant, les adénovirus constituent des vecteurs de transfert de gènes très efficaces pour des applications de thérapie génique et cellulaire. Pour cela, une séquence d'acides nucléiques hétérologue dont le transfert et/ou l'expression dans une cellule, un organe ou un organisme est recherché peut être insérée dans leur génome. Cette

5 séquence peut comporter un ou plusieurs gènes thérapeutiques, tels qu'un gène dont la transcription et éventuellement la traduction dans la cellule cible génèrent des produits ayant un effet thérapeutique. Parmi les produits thérapeutiques, on peut citer plus particulièrement les enzymes, les dérivés sanguins, les hormones, les lymphokines : interleukines, interférons, TNF, etc (FR 9203120), les facteurs de croissance, les neurotransmetteurs ou leurs

10 précurseurs ou enzymes de synthèse, les facteurs trophiques : BDNF, CNTF, NGF, IGF, GMF, aFGF, bFGF, NT3, NT5, etc; les apolipoprotéines : ApoA1, ApoAIV, ApoE, etc (WO94/25073), la dystrophine ou une minidystrophine (WO93/06223), les gènes suppresseurs de tumeurs : p53, Rb, Rap1A, DCC, k-rev, etc (WO94/24297), les gènes codant pour des facteurs impliqués dans la coagulation : Facteurs VII, VIII, IX, etc, les

15 gènes suicides : Thymidine kinase, cytosine désaminase, etc; ou encore tout ou partie d'une immunoglobuline naturelle ou artificielle (Fab, ScFv, etc, WO94/29446), etc. Le gène thérapeutique peut également être un gène ou une séquence antisens, dont l'expression dans la cellule cible permet de contrôler l'expression de gènes ou la transcription d'ARNm cellulaires. De telles séquences peuvent par exemple être transcrites, dans la cellule cible, en

20 ARN complémentaires d'ARNm cellulaires et bloquer ainsi leur traduction en protéine, selon la technique décrite dans le brevet EP 140 308. Le gène thérapeutique peut aussi être un gène codant pour un peptide antigénique, capable de générer chez l'homme une réponse immunitaire, en vue de la réalisation de vaccins. Il peut s'agir notamment de peptides antigéniques spécifiques du virus d'epstein barr, du virus HIV, du virus de l'hépatite

25 B (EP 185 573), du virus de la pseudo-rage, ou encore spécifiques de tumeurs (EP 259 212).

Généralement, la séquence d'acides nucléiques hétérologue comprend également une région promotrice de la transcription fonctionnelle dans la cellule infectée, ainsi qu'une région située en 3' du gène d'intérêt, et qui spécifie un signal de fin transcriptionnelle et un

30 site de polyadénylation. L'ensemble de ces éléments constitue la cassette d'expression. Concernant la région promotrice, il peut s'agir d'une région promotrice naturellement responsable de l'expression du gène considéré lorsque celle-ci est susceptible de fonctionner dans la cellule infectée. Il peut également s'agir de régions d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de

35 séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux ou de toute séquence promotrice ou

dérivée, stimulant ou réprimant la transcription d'un gène de façon spécifique ou non et de façon inductible ou non. A titre d'exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule que l'on désire infecter, ou du génome d'un virus, et notamment, les promoteurs des gènes E1A, MLP d'adénovirus, le promoteur CMV, LTR-RSV, etc. Parmi  
5 les promoteurs eucaryotes, on peut citer également les promoteurs ubiquitaires (HPRT, vimentine,  $\alpha$ -actine, tubuline, etc), les promoteurs des filaments intermédiaires (desmine, neurofilaments, kératine, GFAP, etc) les promoteurs de gènes thérapeutiques (type MDR, CFTR, facteur VIII, etc) les promoteurs spécifiques de tissus (pyruvate kinase, villine, promoteur de la protéine intestinale de liaison des acides gras, promoteur de l'actine  $\alpha$  des  
10 cellules du muscle lisse, promoteurs spécifiques pour le foie ; Apo AI, Apo AII, Albumine humaine etc) ou encore les promoteurs répondant à un stimulus (récepteur des hormones stéroïdes, récepteur de l'acide rétinoïque, etc.). En outre, ces séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique ou majoritaire. Par ailleurs, lorsque l'acide nucléique insère  
15 ne comporte pas de séquences d'expression, il peut être inséré dans le génome du virus défectif en aval d'une telle séquence.

Par ailleurs, la séquence d'acides nucléiques hétérologue peut également comporter, en particulier en amont du gène thérapeutique, une séquence signal dirigeant le produit thérapeutique synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal  
20 peut être la séquence signal naturelle du produit thérapeutique, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle

La cassette d'expression du gène thérapeutique peut être insérée en différents sites du génome de l'adénovirus recombinant, selon les techniques décrites dans l'art antérieur. Elle peut tout d'abord être insérée au niveau de la délétion E1. Elle peut également être  
25 insérée au niveau de la région E3, en addition ou en substitution de séquences. Elle peut également être localisée au niveau de la région E4 déléetée.

Les cellules selon l'invention peuvent également être utilisées pour la production de virus adéno-associés (AAV) recombinants. Ceci constitue une autre application particulièrement avantageuse des cellules de l'invention. Ces cellules permettent en effet  
30 d'obtenir des titres élevés d'AAVr, totalement dépourvus de virus réplicatifs contaminants. A cet effet, la présente invention concerne également l'utilisation d'une cellule comprenant, insérée dans son génome, tout ou une partie de la région E4 du génome d'un adénovirus

comportant au moins la phase de lecture ORF6 pour la production d'AAV recombinants. Les cellules sont avantageusement telles que définies ci-avant.

L'AAV est un virus à ADN de la famille des parvovirus humains, de taille relativement réduite, qui s'intègre dans le génome des cellules qu'il infecte, de manière stable et site-spécifique. Les AAV sont capables d'infecter un large spectre de cellules, sans induire d'effet sur la croissance, la morphologie ou la différenciation cellulaires. Par ailleurs, ils ne semblent pas impliqués dans des pathologies chez l'homme. Le génome des AAV a été cloné, séquencé et caractérisé. Il comprend environ 4700 bases, et contient à chaque extrémité une région répétée inversée (ITR) de 145 bases environ, servant d'origine de répllication pour le virus. Le reste du génome est divisé en 2 régions essentielles portant les fonctions d'encapsidation : la partie gauche du génome, qui contient le gène rep impliqué dans la répllication virale et l'expression des gènes viraux; la partie droite du génome, qui contient le gène cap codant pour les protéines de capsid du virus. L'utilisation de vecteurs dérivés des AAV pour le transfert de gènes in vitro et in vivo a été décrite dans la littérature (voir notamment WO 91/18088; WO 93/09239; US 4,797,368, US5,139,941, EP 488 528). Dans les AAV recombinants, les gènes rep et cap sont généralement délétés et remplacés par un gène d'intérêt.

L'une des difficultés limitant l'utilisation des AAV comme vecteur de thérapie génique provient du fait que l'AAV ne se réplique efficacement que dans les cellules co-infectées par un virus helper comme par exemple l'adénovirus ou le virus de l'herpès. La préparation d'AAV recombinants défectifs implique donc la présence de 3 composants qui doivent être cotransfectés et co-infectés dans la cellule de production : un virus auxiliaire (par exemple un adénovirus), un plasmide contenant une séquence nucléique d'intérêt bordée de deux régions répétées inversées (ITR) d'AAV, et un plasmide portant les gènes d'encapsidation (gènes rep et cap) d'AAV.

L'inconvénient majeur de ce système est qu'il utilise un virus helper. Celui-ci est généralement répliatif et présent en mélange avec les AAVr produits. Les stocks viraux sont donc potentiellement contaminés par un virus helper ce qui rend ces stocks incompatibles avec une utilisation thérapeutique. En outre, en raison du nombre élevé de composants impliqués dans ce procédé, les titres de virus obtenus sont assez faibles, de l'ordre de  $10^8$ .



La présente invention permet de remédier à ces inconvénients. La présente invention fournit en effet un procédé efficace de production d'AAVr, permettant d'obtenir des stocks de virus à titres très élevés (supérieurs à  $10^{10}$ ), non contaminés par un virus répliquatif.

Cinq gènes de l'adénovirus sont nécessaires à la réplication de l'AAV : E1A, E1B, E2A, VA et E4. Ces gènes doivent être présents et s'exprimer dans la cellule productrice pour une production optimale de particule infectieuses. Selon le procédé de l'invention, on utilise maintenant une lignée cellulaire de production contenant déjà dans son génome certains de ces gènes, et notamment tout ou partie de la région E4, préférentiellement combinée à la région E1. L'intérêt d'utiliser ce type de lignée cellulaire est que cela permet d'utiliser un adénovirus helper défectif, c'est-à-dire non capable de générer de manière autonome des particules infectieuses. Ainsi, les stocks d'AAVr produits sont non contaminés.

En effet, les fonctions intégrées dans la lignée peuvent être délétées du génome de l'adénovirus helper.

Ceci est particulièrement avantageux pour l'utilisation d'un adénovirus helper d'origine humaine. Ainsi, dans une lignée cellulaire telle que décrite ci-dessus capable de transcomplementer les fonctions E1 et E4 de l'adénovirus, il est possible d'utiliser un adénovirus helper d'origine humaine (ad5 ou ad2 par exemple) défectif pour ces fonctions. Un tel adénovirus helper ne pouvait être utilisé efficacement dans les procédés de l'art antérieur car l'absence de régions essentielles à la production d'AAVr (E1 et E4) limitait considérablement l'efficacité du procédé. Or, un tel adénovirus est totalement incapable de générer de manière autonome des particules infectieuses. De ce fait, sa présence éventuelle dans un stock d'AAVr n'affecte pas la qualité pharmaceutique de cette préparation.

Ceci permet également l'utilisation plus efficace d'un adénovirus helper d'origine animale, de préférence canine.

En plus des considération de qualité du stock viral produit, de manière tout à fait avantageuse, le procédé selon l'invention permet d'obtenir des titres de virus particulièrement élevés. Ceci est une autre propriété tout à fait remarquable du procédé selon l'invention. Ainsi, les titres produits, pouvant dépasser  $10^{11}$  génomes viraux par ml, sont jusqu'à 1000 fois supérieurs aux titres observés dans l'art antérieur. Ces résultats sont tout à fait inattendus et d'une importance capitale en terme d'exploitation industrielle. Les résultats sont particulièrement remarquables avec les lignées cellulaires dérivées de la lignée

293 et qui expriment ORF6, éventuellement associée à ORF6/7, ou la totalité de E4, sous le contrôle du promoteur MMTV (elles contiennent donc E1 exprimé constitutivement et E4 ou une partie de E4 comprenant au moins ORF6 exprimé conditionnellement en présence de dexaméthasone).

5           Même en l'absence de tout virus helper, ces lignées cellulaires sont capables de répliquer des virus AAV. Ainsi, quand on infecte ces lignées avec un AAV sauvage ou quand on transfecte ces lignées par un plasmide infectieux pAV2 (Mac Laughlin, Gene, 23, 67-73, 1983), on peut faire répliquer l'ADN de l'AAV. L'efficacité de la réplication reste certes inférieure à celle obtenue en présence d'un adénovirus helper, mais démontre les  
10 propriétés particulièrement remarquables des cellules selon l'invention.

          Une lignée cellulaire particulièrement avantageuse pour la mise en oeuvre du procédé selon l'invention est représentée par une cellule de la lignée 293 comprenant, insérée dans son génome, un fragment BglII-BglII correspondant aux nucléotides 34115-32490 du génome de l'Ad5. Il s'agit par exemple d'une cellule de la lignée 293 transformée  
15 par le plasmide pORF6Gen (Cf exemples).

          En coinfectant une cellule de ce type avec un adénovirus helper (par exemple humain au phénotype sauvage, ou délété pour E1, ou un double délétant pour E1 et E4, ou de l'adénovirus canin), et en cotransfectant deux plasmides: un plasmide-AAV, portant les ITRs de l'AAV encadrant un acide nucléique d'intérêt, et un plasmide portant les fonctions rep et cap, on peut produire en présence de dexaméthasone des particules de virus AAV  
20 infectieuses à des titres élevés. Comme indique dans les exemples, des titres en génomes de  $10^{11}$  génomes /ml peuvent être obtenus lorsque l'on opère sur des quantités faibles de cellules. En opérant sur des quantités de cellules plus importantes, des titres plus élevés peuvent être obtenus, jusqu'à  $10^{12}$ . De plus en utilisant de l'adénovirus canin comme virus  
25 helper, le procédé de l'invention permet d'avoir des stocks d'AAV à des titres élevés sans contamination par de l'Ad humain.

          Ainsi, un autre objet de l'invention réside dans un procédé de production d'AAV recombinants caractérisé en ce que l'on introduit dans une culture de cellules comprenant, insérées dans leur génome, une partie de la région E4 du génome d'un adénovirus  
30 comportant au moins la phase de lecture ORF6 :

- un plasmide AAV portant un acide nucléique d'intérêt bordé d'ITRs d'AAV,

- un adénovirus helper. et,
  - les fonctions Rep et Cap de l'AAV,
- puis on récolte les virus produits.

Selon un mode de réalisation particulier, la cellule productrice est une cellule  
5 comportant l'intégralité de la région E4. Selon un autre mode de réalisation particulièrement  
avantageux, la cellule productrice est une cellule comportant une partie de la région E4  
comportant au moins la phase de lecture ORF6 et éventuellement la phase de lecture  
ORF6/7. Il s'agit de manière particulièrement préférée d'une cellule telle que définie  
précédemment pour la production d'adénovirus. En particulier, il s'agit avantageusement  
10 d'une cellule capable de transcomplémenter les fonctions E1 et E4 de l'adénovirus. Un  
exemple préféré est représenté par une cellule de la lignée 293 contenant inséré dans son  
génom, toute la région E4 ou une partie de la région E4 comportant au moins la phase de  
lecture ORF6 et éventuellement la phase de lecture ORF6/7. A titre d'exemple on peut citer  
les cellules Clone#2 (IGRP2) et Clone#4 (IGRP4).

15 Comme indiqué précédemment, l'adénovirus helper peut être un adénovirus humain  
au phénotype sauvage, ou défectif pour la région E1, ou un double délétant pour E1 et E4,  
ou encore de l'adénovirus canin. L'avantage du procédé selon l'invention réside d'une part  
dans les titres très élevés en AAVr, et également dans le caractère sécuritaire des stocks  
qu'il permet de produire. Ainsi, il est particulièrement avantageux d'utiliser un adénovirus  
20 helper défectif, c'est-à-dire incapable de générer de manière autonome des particules  
infectieuses. L'adénovirus helper selon le procédé de l'invention est avantageusement un  
adénovirus humain possédant une délétion dans la région E4. Plus préférentiellement  
encore, il s'agit d'un adénovirus humain défectif pour les régions E1 et E4. Selon un autre  
mode de réalisation avantageux, il s'agit d'un adénovirus canin, de préférence choisi parmi  
25 les souches CAV2.

Dans le procédé selon l'invention, les fonctions rep et cap de l'AAV sont  
préférentiellement apportées par co-transfection des cellules avec un plasmide portant les  
régions rep et cap de l'AAV. Ces régions peuvent être sous contrôle du promoteur P5  
homologue ou d'un promoteur constitutif comme LTR-RSV. Ces fonctions peuvent  
30 également être apportées directement par le virus helper utilisé. Il est en effet possible  
d'insérer dans l'adénovirus helper une cassette contenant les régions rep et cap de l'AAV.

Dans le procédé de l'invention, la transfection du ou des plasmides (plasmide-AAV et plasmide-RepCap le cas échéant) peut être réalisée par toute technique connue de l'homme du métier. Cependant, plus le taux de transfection est bon, plus les niveaux de production peuvent être améliorés. A cet égard, la demanderesse a maintenant mis au point  
5 une méthode particulièrement efficace pour la transfection des plasmides dans les cellules de production. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un lipide polycationique et d'un agent compactant les acides nucléiques. L'un des avantages de cette méthode réside en outre dans le fait qu'elle ne semble pas altérer la morphologie ou l'état physiologique des cellules. Différents types de lipides cationiques peuvent être utilisés, tels que la lipofectamine, le  
10 Transfectam, etc. Parmi les agents compactant l'ADN, on peut citer de manière avantageuse des peptides dérivés de protéines nucléaires telles que les histones, la nucléoline, etc.

Les différents plasmides et virus helper peuvent être introduits dans la cellule productive de manière concomitante ou séparée. Dans le cas d'une introduction séparée, l'ordre dans lequel les différents composants sont introduits ne semble pas être essentiel  
15 pour obtenir des titres élevés. Comme illustré dans les exemples, des titres importants ont été obtenus lorsque, dans un premier temps, les plasmides sont co-transfectés dans les cellules puis, dans un deuxième temps, les cellules sont infectées par le virus helper.

Un mode de réalisation spécifique de l'invention réside dans un procédé de production d'AAV recombinants caractérisé en ce que, dans une culture de cellules  
20 transcomplementant les fonctions E1 et E4 de l'adénovirus, on cotransfecte, en présence d'un lipide polycationique et d'un agent compactant, un plasmide AAV portant un acide nucléique d'intérêt bordé d'ITRs d'AAV et un plasmide portant les régions rep et cap de l'AAV; on co-infecte ladite culture avec un adénovirus helper choisi parmi les adénovirus humains d'origine Ad2 ou Ad5 défectifs pour les régions E1 et E4 et les adénovirus canins  
25 d'origine CAV2, puis on récolte les virus produits.

Ce mode de réalisation permet d'obtenir des titres de virus élevés et des stocks de qualité pharmaceutique.

La présente invention concerne également les préparations virales purifiées (adénovirus et AAV) obtenues selon le procédé de l'invention, ainsi que toute composition  
30 pharmaceutique comprenant un ou plusieurs adénovirus ou AAV recombinants défectifs préparés selon ce procédé. Les compositions pharmaceutiques de l'invention peuvent être formulées en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc.

Préférentiellement, la composition pharmaceutique contient des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. D'autres excipients peuvent être utilisés tels que par exemple un hydrogel. Cet hydrogel peut être préparé à partir de tout polymère (homo ou hétéro) bio-compatible et non cytotoxique. De tels polymères ont par exemple été décrits dans la demande WO93/08845. Certains d'entre eux, comme notamment ceux obtenus à partir d'oxyde d'éthylène et/ou de propylène sont commerciaux. Les doses de virus utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée, du gène à exprimer, ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre  $10^4$  et  $10^{14}$  pfu, et de préférence  $10^6$  à  $10^{10}$  pfu et les AAV, entre  $10^6$  et  $10^{11}$  particules. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une solution d'adénovirus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 15 jours, du nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

Selon le gène thérapeutique, les virus ainsi produits peuvent être utilisés pour le traitement ou la prévention de nombreuses pathologies, incluant les maladies génétiques (dystrophie, fibrose kystique, etc), les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, ALS, etc), les cancers, les pathologies liées aux désordres de la coagulation ou aux dyslipoprotéïnémies, les pathologies liées aux infections virales (hépatites, SIDA, etc), etc.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

#### **Légende des figures**

**Figure 1** : Organisation génétique de l'adénovirus Ad5. La séquence complète de l'Ad5 est disponible sur base de données et permet à l'homme du métier de sélectionner ou de créer tout site de restriction, et ainsi d'isoler toute région du génome.

**Figure 2** Organisation génétique de la région E4

Figure 3 : Organisation génétique de la région E4 dans les adenovirus sauvage et E4 défectifs. La taille de la délétion est représentée par une barre épaisse.

Figure 4 : (A) Représentation schématique de la cassette MMTV LTR/(ORF6 + ORF7). Les oligos 1, 2 et 3 utilisés pour l'amplification ou la RT-PCR sont localisés. + 1 = Site d'initiation de la transcription. AAA = Site de polyadénylation. (B) Structure des produits obtenus par RT-PCR. SD = Site 5' donneur d'épissage. SA = Site 3' accepteur d'épissage.

Figure 5 : Analyse de la production de la fibre adénovirale par détection immunologique à l'aide d'un sérum polyclonal contre la fibre (Boulanger et al.). Les extraits cellulaires sont préparés après 72h d'infection virale, la dexaméthazone est ajoutée en même temps que le virus (concentration finale 600 nM). (A) Infection par le virus dl1014 (MOI = 10); (B) Infection par le virus dl1001 (MOI = 1); Infection par le virus dl1004 (MOI = 10); (wt) Infection par le virus Ad5 (MOI = 10).

Figure 6 : Inductibilité de E4 dans les cellules du clone #2. Analyse des extraits cellulaires non infectés (contrôle inférieur à 0) ou infectés par le virus dl1007, 72 après infection. DM = dexaméthazone (600 nM).

Figure 7 : Stratégie de construction clonale des virus  $\Delta E1$ ,  $\Delta E4$ .

### Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology". John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories). Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide,

extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur. Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'E. coli (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagenèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham. L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant. La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467] en utilisant le kit distribué par Amersham.

### **Exemple 1. Construction de plasmides portant différentes unités fonctionnelles de la région E4 sous contrôle d'un promoteur**

#### **1.1. Construction du plasmide pE4Gen**

Le plasmide pPY2 correspond au clonage du fragment Avr2-SalI (environ 1.3 kb incluant le promoteur du MMTV) du plasmide pMSG (Pharmacia) entre les sites XbaI et SalI du plasmide pIC20H préparé à partir d'un contexte E. coli dam<sup>+</sup>. Le plasmide pPY4 dérive du plasmide pPY2 par délétion d'un fragment de 35 pb après coupure par BamHI et BglII puis religature. Le plasmide pPY5 correspond au plasmide pIC20H dans lequel le fragment TaqI-BglII incluant la région E4 de l'adénovirus de type 5 située entre les positions 35576 (TaqI) et 32490 (BglII), a été cloné entre les sites ClaI et BamHI. La région E4 du plasmide pPY5 est donc incluse dans un fragment EcoRV-SphI que l'on peut cloner après digestion partielle entre les sites SmaI et SphI du plasmide pPY4, ce qui génère le plasmide pPY6. L'insertion du fragment XhoI du plasmide pKIXX (Pharmacia), qui porte un gène conférant la résistance à la généticine chez les cellules 293, dans le plasmide pPY6 génère le plasmide pE4Gen. Ce plasmide porte donc un gène sélectionnable et la totalité de la région E4 de l'adénovirus exprimée à partir du promoteur du MMTV.

Dans ce plasmide particulier ces deux gènes se suivent et les séquences codantes respectives sont portées par le même brin d'ADN. Dans ce plasmide, le site principal 5' donneur pour l'épissage localisé en amont de la phase de lecture ORF1 (vers la position 35548) est donc conservé pour assurer un épissage alternatif correct, permettant de générer les différents produits d'expression de toutes les phases codantes de la région E4 et de manière comparable à l'épissage alternatif observé lors du cycle viral

### 1.2. Construction du plasmide pORF6Gen

Le plasmide pPY13 correspond au clonage du fragment Bgl2-Xba1 du plasmide pPY6 entre les sites correspondants du plasmide pIC20H. Ce fragment de 1.6 kb inclus donc la séquence de l'adénovirus de type 5 de la position 34115 (Bgl2) à la position 32490 (Bgl2, suivi du site Xba1 provenant du multisite de clonage du plasmide pIC20H). Le plasmide pPY13 contient donc la totalité des phases ouvertes de lecture ORF6 et ORF7 de l'adénovirus, maintenant incluses dans un fragment Xho1-Sph1. Le clonage de ce fragment entre les sites Sal1 et Sph1 du plasmide pPY4 génère le plasmide pPY15. L'insertion du fragment Xho1 du plasmide pKIXX, qui porte un gène conférant la résistance à la généticine chez les cellules 293, dans le plasmide pPY15 génère le plasmide pORF6Gen. Ce plasmide porte donc un gène sélectionnable et les phases ouvertes de lecture ORF6 et ORF7 de la région E4 de l'adénovirus exprimée à partir du promoteur du MMTV. Dans ce plasmide particulier ces deux gènes se suivent et les séquences codantes respectives sont portées par le même brin d'ADN. Le premier codon d'initiation de la traduction est celui de la phase ouverte ORF6 (position 34077 dans le génome de l'Ad5), et il est séparé du site CAP du promoteur du MMTV par 235 nucléotides. Dans la mesure où l'épissage alternatif est séquentiel et implique en premier lieu la reconnaissance du site 5' donneur, le site principal 5' donneur localisé en amont de la phase de lecture ORF1 (vers la position 35548) n'a donc pas été inclus dans la construction du plasmide pORF6Gen pour permettre ultérieurement une expression efficace des produits des phases de lecture ORF6 et ORF6/7 (figure 4A).

### 1.3. Construction du plasmide pORF4Gen

Le plasmide pPY14 correspond au clonage du fragment Bgl2-Xba1 de 1,9 kb (obtenu après digestion partielle par l'enzyme Bgl2), du plasmide pPY6 entre les sites correspondants du plasmide pIC20H. Ce fragment de 1.9 kb inclus donc la séquence de l'adénovirus de type 5 de la position 34387 (Bgl2) à la position 32490 (Bgl2, suivi du site Xba1 provenant du multisite de clonage du plasmide pIC20H). Le plasmide pPY14 est donc



isogénique au plasmide pPY13 à l'exception qu'il inclus en plus un fragment Bgl2 correspondant à la quasi totalité de la phase ouverte de lecture ORF4. Ce plasmide contient donc la totalité des phases ouvertes de lecture ORF4, ORF6 et ORF7 de l'adénovirus, maintenant incluses dans un fragment Xho1-Sph1. Le clonage de ce fragment entre les sites

5 SalI et SphI du plasmide pPY4 génère le plasmide pPY16. L'insertion du fragment XhoI du plasmide pKIXX, qui porte un gène conférant la résistance à la généticine chez les cellules 293, dans le plasmide pPY16 génère le plasmide pORF4Gen. Ce plasmide porte donc un gène sélectionnable et les phases ouvertes de lecture ORF4, ORF6 et ORF7 de la région E4 de l'adénovirus exprimée à partir du promoteur du MMTV. Dans ce plasmide

10 particulier ces deux gènes se suivent et les séquences codantes respectives sont portées par le même brin d'ADN. Comme pour le plasmide pORF6Gen, le site principal 5' donneur localisé en amont de la phase de lecture ORF1 (vers la position 35548) n'a pas été inclus dans la construction du plasmide pORF4Gen pour permettre ultérieurement une expression efficace des produits des phases de lecture ORF4, ORF6 et ORF6/7.

#### 1.4. Construction des plasmides pJY1 et pJY2

Cet exemple décrit la construction d'un plasmide comportant une unité fonctionnelle de E4 (Cf exemple 1.2.) sous contrôle d'un promoteur dérivé du MMTV. Plus particulièrement, ce promoteur est un dérivé du MMTV comprenant 5 éléments de réponse aux glucocorticoïdes, c'est à dire un dérivé hautement inductible par les glucocorticoïdes.

20 Ce plasmide a été construit de la manière suivante.

Le fragment BglII de l'Ad5 (position 34115 à 32490) inclus les séquences (ORF6+ORF7) de la région E4. Ce fragment a d'abord été cloné entre les sites BglII et BamHI du plasmide pIC20H (Marsh et al., Gene 32 (1984) 481), ce qui génère le plasmide pPY13 dans lequel le site BglII situé en amont de ORF6 est conservé. Le fragment BglII-SalI du plasmide pPY13 inclus donc la totalité des séquences (ORF6+ORF7) de la région

25 E4 de l'Ad5. Ce fragment a été cloné entre les sites BamHI et SalI du plasmide pIC20H, ce qui génère le plasmide pPY45.

Le fragment XbaI (environ 1 kb) du plasmide pGRE5-1 (Mader et White, PNAS 90 (1993) 5603) correspond à un promoteur dérivé du MMTV, hautement inductible par les glucocorticoïdes. Ce fragment a été isolé et cloné entre les sites XbaI du plasmide pIC20H isolé à partir d'un contexte dam-. Le plasmide obtenu a été désigné pPY21. Dans ce plasmide, le site BglII provenant du multisite de clonage du plasmide pIC20H est localisé immédiatement en amont des 5 éléments du promoteur capables de lier le récepteur

30

nucléaire aux glucocorticoïdes. Le fragment BglII-EcoRI du plasmide pPY21, contenant le promoteur hautement inducible par les glucocorticoïdes, a ensuite été cloné entre les sites BglII et EcoRI du plasmide pIC20H, ce qui génère le plasmide pPY26.

5 Le clonage du fragment EcoRI-SphI du plasmide pPY45 entre les sites correspondants du plasmide pPY26 génère le plasmide pJY1 qui contient les séquences (ORF6+ORF7) de l'Ad5 sous contrôle du promoteur hautement inducible par les glucocorticoïdes (cassette pGRE5/(ORF6+ORF7)).

10 Un dérivé de pJY1 a également été construit contenant un gène de résistance à la généticine. Le fragment XhoI-SalI du plasmide pMSCV contient un gène bactérien conférant la résistance aux cellules eucaryotes à la généticine (APH), exprimé à partir d'un promoteur fort et ubiquitaire (PGK) chez les cellules. Ce fragment a été cloné dans le plasmide pJY1, au site salI. Le plasmide obtenu a été désigné pJY2. Ce plasmide contient les cassettes d'expression pGRE5/(ORF6+ORF7) et PGK/APH transcrites dans la même direction.

15 1.5. Construction du plasmide pGG0

L'assemblage des parties GCR (HBD) et ORF6+ORF7 de la région E4 de l'Ad5 est réalisé après amplification PCR en utilisant le plasmide pSG5HGR comme matrice et les déoxyoligonucléotides SEQ ID N°5

5'-GGCCCGCCGCCACCATGGATATTGAACCTGAAGTGTTATATGCAGGA-3'

20 (le site SmaI est en italique; la séquence consensus Kozak d'initiation de la traduction est en gras; le codon spécifiant le résidu 539 du GCR est souligné) et SEQ ID N°6

5'-CTCGAGAACGCCGGACGTAGTCTTTTGATGAAACAGAAG-3'

25 (le site XhoI est en italique; le site Tth111I est en gras; le codon spécifiant le résidu 777 du GCR est souligné). L'oligonucléotide SEQ ID N°5 permet donc de positionner un ATG spécifiant l'initiation de la traduction en amont du domaine HBD du GCR allant des acides aminés 539 à 777 du GCR. L'oligonucléotide SEQ ID N°6 permet de positionner un site de restriction Tth111I en aval du HBD. Le fragment d'amplification PCR a d'abord été cloné dans le plasmide commercial pCRII et le criblage blanc-bleu a permis de sélectionner  
30 un clone dont l'identité a été vérifiée par séquençage (plasmide pCRII/GCR). Ce plasmide

est donc la source d'un fragment SmaI-XhoI qui porte le domaine HBD du GCR ayant subi l'amplification PCR avec les oligos SEQ ID N°5 et SEQ ID N°6.

Le plasmide pMEL3 est une construction intermédiaire qui contient le "polylinker" EcoRI-PstI du plasmide pSL1180 inséré entre les sites EcoRI et PstI d'un dérivé du  
5 plasmide pIC20H dans lequel le site Hind3 situé à proximité immédiate du site NruI sur le "polylinker" a été traité par le fragment Klenow de la Polymérase I d'E. coli puis religaturé sur lui-même, ce qui transforme le site Hind3 en un site NheI. Le plasmide pMEL3 contient également un fragment BamHI correspondant au signal de polyadénylation de SV40, préalablement inséré dans le site Bgl2 du "polylinker" de pIC20H. Le fragment SmaI-XhoI  
10 du plasmide pCRII/GCR qui contient le domaine HBD du GCR a alors été inséré entre les sites correspondants du plasmide pMEL3, ce qui génère le plasmide pMEL3/GCR

Après digestion totale du plasmide pPY13 par Hinc2, digestion partielle par SspI puis religature du plasmide sur lui-même, on génère le plasmide pPY13 ( $\Delta$  Hinc2-SspI) qui  
15 contient un fragment Hind3 d'environ 1.4 kb contenant la totalité de la séquence ORF6+ORF7 de la région E4 de l'Ad5, incluant son site de polyadénylation.

Le plasmide pPY13 ( $\Delta$  Hinc2-SspI) a été digéré par Hind3 et ses extrémités ont été remplies à l'aide de la Polymérase Klenow. Ce plasmide est ensuite digéré par XhoI, et les séquences ORF6+ORF7 (environ 1.4 kb) sont alors clonées entre les sites XhoI et NruI du plasmide pMEL3/GCR, ce qui génère le plasmide pMEL3/GCR-Tth1111-(ORF6+ORF7).

20 Le couplage du site Tth1111 introduit à l'aide de l'oligonucléotide SEQ ID N°6 avec le site Tth1111 situé immédiatement en aval de l'ATG traductionnel de ORF6 sur la séquence de l'Ad5 (position 34070) permet de réaliser un couplage traductionnel entre le domaine HBD du GCR et la protéine ORF6. Le plasmide pMEL3/GCR-Tth1111-(ORF6+ORF7) est donc digéré par Tth1111 puis religaturé sur lui-même, ce qui génère le  
25 plasmide pMEL3/GCR-(ORF6+ORF7). Cette construction a été séquencée pour s'assurer du couplage traductionnel entre le domaine HBD du GCR et ORF6. La séquence du gène chimérique obtenue est présentée séquence SEQ ID N°7. Celle de la protéine résultante GCR-ORF6 est présentée séquence SEQ ID N°8

Le traitement du plasmide pPY26 par EcoRI et le fragment Klenow de la  
30 Polymérase I d'E. coli, puis par Bgl2 génère un fragment incluant le promoteur inductible GRE5, dont le clonage entre les sites ApaI traité par le fragment Klenow et BamHI du plasmide pMEL3/GCR-(ORF6+ORF7) génère le plasmide pMEL3/GRE-(GCR-

ORF6+ORF7). Ce plasmide est la source d'un fragment Bgl2-Nhe1 correspondant à la cassette d'expression codant pour la fusion GCR-(ORF6+ORF7) exprimée à partir du promoteur GRE5 et dont le clonage entre les sites Bgl2 et Xba1 du plasmide pCI-Neo (Promega) génère le plasmide pGG0.

## 5      Exemple 2 - Construction des lignées cellulaires

Cet exemple décrit la construction de lignées cellulaires complémentantes pour les régions E1 et E4 des adénovirus selon l'invention. Ces lignées permettent la construction et la propagation d'adénovirus recombinants délétés pour ces régions, sans avoir recours à un virus helper.

10      Les lignées de l'invention ont été construites par co-transfection des cellules choisies en présence de phosphate de calcium, par les plasmides décrits dans l'exemple 1 et une construction codant pour le récepteur aux glucocorticoïdes (Hollenberg et al., Nature, 318, (1985) 635-641). Plus précisément, les cellules de la lignée 293 en boîtes de 5cm de diamètre ont été transfectées par 1 à 5 µg de plasmide E4 (pE4Gen, pORF6Gen, 15 pORF4Gen, pGG0 ou pJY2) et éventuellement 5 µg d'un plasmide d'expression du récepteur humain aux glucocorticoïdes exprimé à partir du promoteur précoce du virus SV40 (plasmide pSG5HGR), en présence de phosphate de calcium, selon le protocole décrit par Graham et Van der Eb (Virology 52 (1973) 456).

### 2.1. Sélection des clones résistants à la généticine

20      Après transfection des cellules, celles ci sont lavées, puis le milieu de culture (MEM, Sigma) supplémenté en sérum de veau foetal (7% final) est ajouté et les cellules sont mises à incuber pendant 20 heures. Le lendemain, on sélectionne les cellules en présence de généticine à la concentration effective de 350 mg/l. La généticine est changée tous les trois jours et les clones sélectionnables apparaissent après environ 3 semaines. Quand toutes les 25 cellules non transfectées sont mortes, seules les cellules ayant inséré le gène de résistance subsistent et se divisent pour générer des clones cellulaires. Quand les clones cellulaires sont suffisamment gros pour être visibles à l'oeil nu, ils sont individuellement transférés dans les puits de culture d'une plaque de culture "24 trous". Chaque clone est ensuite progressivement amplifié en présence de généticine d'abord dans les puits d'une plaque de culture "12 trous", puis "6 trous" pour être ensuite amplifié en boîtes de culture cellulaires. 30 Chaque clone cellulaire est alors conservé par congélation dans l'azote liquide.

## 2.2. Sélection des clones capables de produire des virus déficients pour E4.

Les adénovirus Ad2dl808 (Weinberg et Ketner, J. Virol. 57 (1986) 833), Ad5dl1004, dl1007 ou dl1014 (Bridge et Ketner, J. Virol. 63 (1989) 631), dl1011 (Bridge et al., Virology 193 (1993) 794) sont des mutants de délétion portant des délétions importantes au niveau de la région E4. Ces mutants sont incapables de se répliquer dans les cellules 293, mais peuvent être produits dans les cellules W162 (Weinberg et Ketner, PNAS 80 (1983) 5383). Dans une seconde étape, les 50 clones résistants à la généticine ont été testés pour leur capacité à produire ces virus E4<sup>-</sup> et donc à transcomplémenter la région E4. 60 clones transfectés par le plasmide pJY2, résistant à la généticine, ont également été criblés pour cette capacité à transcomplémenter la région E4.

Pour cela, chaque clone est infecté en milieu liquide par le virus dl808 à une multiplicité d'infection d'environ 0,1 PFU/cellule (le titre viral est obtenu sur la lignée W162). L'infection a été réalisée à une moi de 0,5 pfu/cellule pour les clones pJY2, dans un milieu supplémenté en dexaméthazone (1µM). L'apparition d'un effet cytopathique amplifiable par réinfection successive des cellules par le lysat cellulaire obtenu est indicateur d'une certaine propagation virale de dl808 par les cellules du clone considéré. Cette transcomplémentation est ensuite objectivée à la fois par analyse du niveau de répllication virale et la faculté des cellules à former des plages virales (un protocole possible est décrit par Hitt, M.; Bett, A.J.; Prevec, L. et Graham, F.L. "Construction and propagation of human adénovirus vectors" in: Cell Biology; a Laboratory Handbook. Volume 1. J.E. Celis (Ed); Academic Press Inc. (San Diego, CA, USA). p479-490) après infection par dl808

Cette étape a permis de mettre en évidence plusieurs clones particuliers présentant des propriétés efficaces de transcomplémentation de la région E4. Le premier, désigné Clone#2, résulte de la transfection du plasmide pORF6Gen; le second, désigné Clone#4, a été isolé après transfection du plasmide pE4Gen. Des clones stables, capables de transcomplémenter pour la région E4, et hautement inductibles par les glucocorticoïdes ont également été obtenus après transfection des cellules 293 par le plasmide pJY2. Par ailleurs, d'autres clones stables, capables de propager efficacement des virus défectifs pour la région E4, et hautement inductibles par un composé non stéroïde ont encore été préparés. Ces clones ont été obtenus par co-transfection des cellules 293 par le plasmide pJY2 et par un plasmide exprimant un transactivateur artificiel composé d'une région transactivatrice (VP16), de la région qui lie l'ADN provenant du récepteur aux glucocorticoïdes, et d'une partie tronquée en C-terminal du récepteur à la progestérone, de telle sorte que ce récepteur

hybride soit capable de transactiver le promoteur GRE5 en présence de RU486 et non de stéroïdes. Les clones obtenus sont effectivement capables de propager efficacement des virus E4-défectifs en présence de RU486.

5 Le plasmide pGG0 seul, ou une combinaison équimoléculaire des plasmides pGG0 et pSG5HGR sont transfectés dans des cellules permissives pour l'adénovirus de type 2 ou 5, et les clones stables sont sélectionnés en présence de 400 mg/l de généticine. Par exemple, la transfection du plasmide pGG0 dans les cellules 293 génère le clone IGRP18 qui permet la propagation des virus doublement défectifs pour E1 et E4 en présence de dexaméthasone (1µM), ce qui n'est pas le cas en l'absence d'addition.

10 2.3. Capacité à propager des adénovirus déficients pour E1.

La capacité des lignées préparées à compléter la région E1 a été vérifiée après infection par l'adénovirus Ad-RSVβGal. Cet adénovirus de première génération (déficient dans E1 seulement), comprend le gène LacZ de E.coli sous contrôle du promoteur du LTR du virus RSV (Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest. 90 (1992) 626). Les cellules des clones #2, #4 et des cellules obtenues avec pJY2 ont été infectées par le virus Ad-RSVβGal et une propagation virale a été observée pour chaque clone.

Ces résultats montrent que la capacité des cellules à transcomplémenter la région E1 n'a pas été affectée par l'introduction supplémentaire de la partie distale de la région E4 (clone #2, cellules pJY2) ou de la région E4 complète (clone #4).

20 2.4. Analyse en Southern, Northern blot et RT-PCR pour vérifier l'intégration d'une unité E4 fonctionnelle dans le génome.

Les cellules des clones #2 et #4 ont été analysées en Southern blot pour vérifier l'expression des protéines virales. Plus particulièrement, l'analyse en Southern Blot (analyse du DNA génomique hybridant avec une sonde radioactive provenant de la région E4 adénovirale) a été réalisée selon le protocole décrit par Maniatis et al. A cet effet, l'ADN génomique des cellules 293 et #2 a été préparé. 2 µg de cet ADN ont été utilisés comme matrice dans une réaction de PCR réalisée en présence de Polymérase Taq, de l'oligo 1 de séquence SEQ ID n°1 (correspondant aux nucléotides 52 à 71 du promoteur MMTV) et de l'oligo 2 de séquence SEQ ID n°2 (correspondant aux positions 32921-32940 du génome de l'Ad5). Ces oligo amplifient un fragment de 2617 pb du plasmide pORF6Gen. L'amplification a été réalisée dans les conditions suivantes : dénaturation à 94°C pendant 5

min, 30 cycles d'amplification par dénaturation à 94°C pendant 1 min, hybridation à 60°C pendant 2 min, et extension à 70°C pendant 3 min, l'extension lors du dernier cycle étant prolongée pendant 10 min. Les produits d'amplification ont ensuite été analysés par électrophorèse SDS 1 % d'agarose et identifiés en Southern Blot et hybridation avec une sonde marquée couvrant la région (ORF6 + ORF7) de l'adénovirus ou la région MMTV.

L'analyse en Northern Blot et RT-PCR (analyse des ARNs cellulaires des clones 2 et 4 hybridant avec une sonde radioactive provenant de la région E4 adénovirale) a été réalisée selon le protocole décrit par Maniatis et al., les ARNs cellulaires polyadénylés ayant été préparés selon le protocole décrit par R.E. Farrell Jr. "RNA isolation strategies". in: RNA Methodologies; a Laboratory Guide for Isolation and Characterization. Academic Press Inc. (San Diego, CA, USA). p46-92). Pour la RT-PCR, 500 ng des ARN polyA<sup>+</sup> ont été traités avec 0,5 unité de DNase I puis soumis à une transcription inverse avec une amorce oligo(dT). Un dixième de la préparation d'ADNc simple brin ainsi obtenue a été utilisé comme matrice dans une réaction de PCR réalisée au moyen de l'oligo 2 (SEQ ID n°2) et de l'oligo 3 (SED ID n°3), correspondant aux nucléotides 227-246 par rapport au site cap du promoteur MMTV (voir figure 4). Ces oligo ont été construits pour amplifier un fragment de 1255 pb de l'ARNm non épissé ORF6 et un fragment de 545 pb de l'ARNm épissé ORF6/7. Les produits d'amplification ont été analysés en gel SDS 1 % d'agarose et identifiés en Southern Blot et Hybridation à la sonde (ORF6+ORF7) marquée.

Ces analyses ont permis de montrer que ces 2 clones possèdent leur unité fonctionnelle E4 respective intégrée à raison de quelques copies par cellules. De plus, ces études démontrent que ces deux clones expriment la protéine de la fibre de l'adénovirus après infection avec les mutants de délétion Ad5dl1004, Ad5dl1011 et Ad5dl1014 (Figure 5). Cette protéine est une protéine tardive du cycle réplcatif et infectieux de l'adénovirus, dont la synthèse implique l'expression de E4. La présence de cette protéine dans les cellules infectées par les mutants E4<sup>-</sup> confirme que ces cellules expriment bien une activité E4 fonctionnelle.

Les analyses en Southern Blot indiquent plus particulièrement que le clone #2 contient une copie de la cassette MMTV-(ORF6+ORF7) intégrée dans son génome. L'intégrité de cette cassette a en outre été démontrée par l'amplification au moyen des oligos 1 et 2 qui génère un fragment de 2,6 Kb attendu, qui peut être spécifiquement détecté par une sonde radiomarquée correspondant à l'unité (ORF6+ORF7) ou au promoteur MMTV (figure 4). L'occurrence d'un épissage alternatif correct dans les cellules de l'invention a

également été démontrée par RT-PCR. Ainsi 2 signaux principaux ont été détectés spécifiquement avec la sonde radiomarquée (ORF6+ORF7) dans le clone #2 non infecté, cultivé en présence de dexaméthazone (conditions inductrices). Le signal le plus important est un fragment de 1,3 kb environ, taille qui correspond parfaitement à un produit non épissé dérivé de ORF6/ORF7. L'autre signal est un fragment de 0,6 kb environ, taille en accord avec l'excision (lors de l'épissage) de l'intron de 712 nucléotides générant le messager ORF6/7. Ces résultats montrent clairement qu'un épissage alternatif correct se produit dans les cellules de l'invention, et que les deux produits ORF6 et ORF6/7 de la région E4 sont bien exprimés dans ces cellules.

La capacité des cellules de l'invention à exprimer un produit fonctionnel de la région ORF6 a par ailleurs été démontrée par immunodétection de la protéine de la fibre. Les résultats obtenus montrent que les cellules 293 infectées par l'adénovirus Ad5 dl1007 ne produisent pas de fibres. Au contraire, un signal fibre-spécifique est détecté dans les cellules de l'invention (clone #2 notamment) après infection par ce mutant, et pas dans les autres cellules non infectées. La présence de la fibre a également été démontrée dans les cellules de l'invention infectées par les mutants dl808, dl1004 (ORF1<sup>+</sup>), dl1011 ou dl 1014 (ORF4<sup>+</sup>) en présence de dexaméthazone.

### 2.5. Formation de plages

Cette analyse montre clairement les propriétés particulièrement avantageuses des lignées selon l'invention. En effet, alors que les deux clones (clone#2 et clone#4) sont capables de transcomplémenter la région E4 et de propager avec une efficacité comparable les mutants Ad2dl808 ou Ad5dl1004 par exemple, ils présentent une différence très significative en ce qui concerne la formation de plages de virus après infection par les mutants Ad2dl808, Ad5dl1004, Ad5dl1007, Ad5dl1011 ou Ad5dl1014.

La capacité de former des plages de virus est une propriété essentielle des lignées de production. C'est en effet sous cette condition que des clones de virus recombinants peuvent être isolés, puis amplifiés et purifiés. Les résultats obtenus montrent clairement que la formation de plages de virus est toujours observée avec le clone#2, alors que cela ne se produit que rarement avec le clone#4. Ces résultats démontrent clairement les propriétés très supérieures des lignées de l'invention dans lesquelles seulement une unité fonctionnelle particulière de la région E4 est intégrée.



## 2.6. Expression régulée de l'activité E4

Une autres propriété avantageuse du clone#2 selon l'invention réside le caractère régulé et inductible de l'expression de l'activité E4. Ainsi, les résultats obtenus montrent que la formation de plages de virus n'est observée qu'en présence de dexaméthazone. De même, dans le clone#2, l'expression de la protéine de fibre de l'adénovirus après infection par le mutant Ad5dl1007 est significativement augmentée dans les conditions d'induction (figure 6). Les mêmes résultats ont été obtenus avec les mutants Ad5dl808, Ad5dl1004, Ad5dl1011 et Ad5dl1014. En revanche, l'expression de l'activité E4 dans le clone#4 est constitutive.

L'ensemble de ces résultats démontre clairement les avantages des lignées cellulaires de l'invention dans lesquelles seulement une unité fonctionnelle particulière de la région E4 est intégrée. Ces avantages résident en particulier dans la capacité à former des plages de virus et à permettre l'amplification des virus défectifs en milieu liquide. Ces avantages sont également dans le caractère régulé de l'expression de l'activité E4, contrairement aux lignées dans lesquelles des unités fonctionnelles plus grandes de E4 sont présentes.

### Exemple 3 - Production de virus défectifs pour les fonctions E1 et E4

Cet exemple décrit l'utilisation des lignées cellulaires selon l'invention pour la production de virus recombinants déficients dans les régions E1 et E4. Ces adénovirus ont été produits par recombinaison homologue, après co-transfection, dans les cellules de l'invention, de deux fragments d'ADN, l'un apportant la partie gauche du génome du virus recombinant (possédant une délétion dans la région E1), l'autre apportant la partie droite du génome du virus recombinant (possédant une délétion dans la région E4).

Plus précisément, les cellules 293E4 (clone#2 et #4) ont été cotransfectées par 10 mg de l'ADN du virus Ad-RSVBGal (Stratford-Perricaudet et al.) digéré par SrfI (ou 5 mg d'ADN du plasmide ayant servi à la construction de ce virus et digéré par XmnI), et 10 mg de l'ADN du virus apportant la délétion fonctionnelle de la région E4 (par exemple Ad2dl808, Ad5dl1004, Ad5dl1007 ou Ad5dl1014) digéré par l'enzyme ClaI. Après apparition de l'effet cytopathique, les virus sont purifiés par au moins deux cycles consécutifs d'étalement en solide pour la formation de plages sur clone 2. Les plages correspondant à l'infection du virus recherché (analyse de l'ADN démontrant la double délétion E1 et E4) sont alors amplifiées par des cycles d'infection consécutives. Des stocks à titre élevés sont préparés par purification sur gradient de chlorure de césium. Les virus sont conservés à -80°C selon les techniques classiques de l'homme de l'art.

Outre la faculté du clone 2 à faire des plages virales, il permet une propagation en milieu liquide particulièrement efficace pour le virus AD5dl1014 ( $E1^{-}E4^{-}$  mais  $ORF4^{+}$ ) ou pour le virus  $E1^{-}E4^{-}$  construit à partir du virus dl1014.

5 Par contre le clone 4 obtenu après transfection du plasmide pE4Gen n'est pas très performant pour faire des plages car il a du mal à tenir la confluence cellulaire pendant un temps suffisamment long pour que les plages de lyse virale soient facilement repérables (et surtout si le virus recombinant recherché ne code pas pour la  $\beta$ -galactosidase)

10 Une méthode alternative de production repose sur la construction clonale des virus selon l'invention. Plus particulièrement, selon cette méthode, les adénovirus  $\Delta E1\Delta E4$  sont produits par double-recombinaison homologue in vivo après co-transfection de 3 fragments d'ADN recouvrants, apportant chacun une partie du génome du virus.

Plus particulièrement, les 3 fragments recouvrants suivants, dérivés des génomes AdRSV $\beta$ gal et Ad dl1014, ont été purifiés par électroélution (Figure 7) :

15 i) Fragment I : Ce fragment est un fragment NarI de 6,8 kb codant pour la  $\beta$ gal correspondant à la partie gauche ( $\Delta E1$ ) du génome de AdRSV $\beta$ gal. Sa contamination par un génome AdRSV $\beta$ gal non coupé (et donc répliquatif) est fortement improbable car la digestion complète par NarI génère ce fragment parmi 25 autres allant de 26 nucléotides à 3,8 kb.

20 ii) Fragment II : Ce fragment est un fragment DraI de 9,4 kb également dérivé du génome de AdRSV $\beta$ gal, et qui se chevauche avec le fragment I sur 1509 nucléotides (cf Figure 7). La contamination de ce fragment par un génome infectieux est également impossible dans la mesure où ce fragment a été purifié à partir de 10 fragments supplémentaires de taille comprise entre 494 nucléotides et 4,8 kb, après digestion totale par DraI et Afl II.

25 iii) Fragment III : Ce fragment est un fragment NsiI de 21,3 kb dérivé du génome de Ad5 dl1014. Il chevauche le fragment II sur 1652 nucléotides (Figure 7). Ce fragment apporte la partie droite du génome du virus recombinant, contenant la région E4 modifiée ( $\Delta E4, ORF4^{+}$ ). Sa contamination est encore une fois plus qu'improbable puisqu'il a été purifié après digestion complète par NsiI générant 7 fragments de taille comprise entre 178  
30 nucléotides et 4 kb.

Les fragments purifiés ont été co-transfectés dans les cellules clone #2 selon le protocole décrit pour les cellules 293, en présence de 1  $\mu$ M de dexaméthazone dans le milieu (ajouté tous les 4 jours pendant 3 semaines). Au terme de cette culture, les cellules ont été récoltées, congelées et décongelées 3 fois dans un bain glace/éthanol, puis centrifugées à 3000 g pendant 20 min. Le lysat cellulaire a ensuite été ajouté à une culture fraîche de cellules clone #2 (également désignées IGRP2) en présence de dexaméthazone (1  $\mu$ M). Après 5 jours, un effet cytopathique a été observé, démontrant la production des virus. Un stock de ce virus recombinant Ad $\Delta$ E1,  $\Delta$ E4, ORF4<sup>+</sup> a été obtenu après amplification progressive du mélange induisant l'effet cytopathique sur 100 boîtes de 10 cm contenant des cellules clone #2 à sous-confluence, en présence de 1  $\mu$ M dexaméthazone. Après purification sur gradient de chlorure de césium et dialyse à 4°C, le stock viral a été titré sur monocouches de cellules clone #2 supplémentées de dexaméthazone (1  $\mu$ M), avant coloration in vitro avec du X-Gal. Dans la mesure où toutes les plaques sont positives, le titre peut-être exprimé soit en pfu / ml soit en plaque virale exprimant la  $\beta$ -gal. Selon cette procédure, un stock de 10<sup>10</sup> pfu a été préparé. L'absence de RCA dans ce stock a ensuite été contrôlée par analyses de restriction et en southern. Pour cela l'ADN viral d'un recombinant du stock a été préparé selon la technique de Challberg (Virology 114 (1981) 196). 2  $\mu$ g de cet ADN ont été soumis à une analyse de restriction et gel d'agarose 1 %. Les fragments ont été transférés sur membrane Hybond-N (Amersham) et hybridés avec une sonde radioactive correspondant aux ITRs de l'adénovirus pour détecter spécifiquement les fragments localisés aux extrémités du génome viral.

L'analyse de restriction par les enzymes SmaI, AflII ou StuI a donné les profils attendus, pour des préparations non contaminées par des fragments E1<sup>+</sup> ou E4<sup>+</sup> comme en témoigne la stoechiométrie relative des différents fragments de restriction.

L'analyse en Southern après transfert sur membranes montre que la digestion par StuI génère seulement 2 fragments hybridant avec la sonde ITR : Un de ces fragments présente une mobilité correspondant à celle du fragment de 1125 pb de AdRSV $\beta$ gal codant pour la  $\beta$ gal, l'autre migre comme le fragment StuI de 2673 pb de Ad5dl1014 portant la délétion E4. Une exposition prolongée de l'autoradiogramme ne fait apparaître aucune bande supplémentaire ayant une taille correspondant au fragment E1<sup>+</sup> (3158 bp) ou E4<sup>+</sup> (3980 pb). De même, un fragment correspondant en taille (3267 pb) à l'introduction de l'unité E4 fonctionnelle (ORF4 + ORF6 + ORF7) dans le génome du recombinant n'a pas été détecté, démontrant qu'il n'y a pas eu d'événement de double recombinaison pendant la production entre le génome viral et l'unité E4 intégrée dans la cellule. Ces résultats

démontrent donc que les cellules de l'invention peuvent être utilisées pour produire efficacement des lots de virus  $\Delta E1$ ,  $\Delta E4$  dépourvus de RCA.

#### **Exemple 4 - Production d'AAV recombinants**

5 Cet exemple décrit l'utilisation des lignées cellulaires contenant tout ou une partie de la région E4 d'un génome adénoviral pour la production d'AAV. Ces AAV ont été produits par co-transfection, dans lesdites cellules, d'un plasmide ITR-AAV et d'un plasmide Rep/Cap, et par co-infection avec un adénovirus helper.

#### **Plasmides et virus utilisés**

10 - Plasmide ITR-AAV, désigne pMA10. Ce plasmide comporte un acide nucléique d'intérêt (cassette d'expression du gène  $\beta$ -gal d'E.coli composée du promoteur du LTR-RVS, du gène LacZ précédé d'un signal de localisation nucléaire, et du site de polyadénylation du virus SV40) borde de 2 ITR d'AAV. Le plasmide pMA10 a été obtenu en digérant le plasmide pXL2582 par SpeI et en refermant par traitement à l'ADN ligase du bactériophage T4. Ce traitement permet de supprimer les séquences palindromiques en aval  
15 de l'ITR gauche de l'AAV. Le plasmide pXL2582 a été obtenu en ligaturant les fragments suivants dans les sites EcoRI-KpnI de pXL2359 (décrit dans la demande FR94 02445) :

a) EcoRI-XbaI (contenant l'ITR gauche de l'AAV jusqu'au nucléotide 155, site HinfI sur la séquence publiée de l'AAV) de pXL2580, et,

b) XbaI-KpnI de pXL2359 (contenant la cassette d'expression du gène LacZ)

20 Le plasmide pXL2580 a été obtenu à partir de pXL2359 de la manière suivante : pXL2359 a été digéré par EcoRI-XbaI et déposé sur gel d'agarose 1%, d'où un fragment de 650 pb a été purifié. Ce fragment a été redigéré par HinfI et traité à l'ADN Polymérase du bactériophage T4, recoupe par PstI puis déposé sur gel d'agarose 2%, d'où un fragment de 200 pb a été purifié. Ce fragment, contenant l'ITR gauche de l'AAV jusqu'au nucléotide  
25 155 a été introduit entre les sites PstI-SmaI de pBSKS+ (Stratagene).

- Plasmide Rep/Cap : Le plasmide utilise, désigne p $\Delta$ Bal, a été décrit par Lebkowski et al (Mol. Cel. Biol. 8 (1988) 3988). Ce plasmide contient les régions rep et cap de l'AAV sous contrôle du promoteur endogène P5. D'autres promoteurs peuvent être substitués au promoteur P5, tels que notamment le promoteur constitutif du LTR-RVS.

- L'adénovirus helper utilise est un adénovirus sauvage Ad5. Il est entendu que d'autres virus helper peuvent être utilisés, et notamment un Ad5 défectif pour la région E1 et/ou E4, ou un adénovirus canin. L'intérêt d'utiliser un adénovirus canin réside dans leur capacité à supporter la réplication des AAV tout en étant des virus défectifs chez l'homme.

5 De ce fait, les préparations d'AAVr obtenues sont totalement dépourvues de RCA et d'adénovirus humain contaminant.

### Protocole

La production a été réalisée par transfection de 20 boîtes de 5 cm de diamètre de cellules Clone#2 (IGRP2), à la densité de  $3 \cdot 10^6$  cellules par boîte environ, préalablement

10 inoculées 24 à 48 heures dans du milieu MEM 10%SVF. Dans chaque boîte ont été co-transfectés 1 µg de plasmide pMA10 et 5 µg de plasmide pΔBal en présence de 16 µg de peptide H1, de 16,5 µl de lipofectamine (Gibco-BRL, Life Technologies) et de OPTIMEM lipofectamine (Gibco-BRL, Life Technologies) selon les recommandations du fournisseur. Après 4 à 16 heures de contact du mélange sur les cellules, le mélange de transfection a été

15 retiré et les cellules ont été infectées pendant une heure avec l'adénovirus helper, avec une infectivité de 10 pfu de virus par cellule dans un volume final de 500 µl. Du milieu MEM10%SVF + dexaméthasone  $10^{-6}$  M a ensuite été ajouté. Les cellules ont été récoltées 5 jours après, reprises dans un tampon Tris HCl 10 mM, pH 8, lysées par 3 congélations décongélations, puis traitées avec du déoxycholate de sodium et à la trypsine aux

20 concentrations respectives de 0.25% et de 1% pendant 30 min à 37°C. Les AAV recombinants produits ont ensuite été purifiés sur gradient de chlorure de césium à la densité de 1.4, dans un rotor SW55.1 à 35000rpm pendant 20 heures.

Ces expériences ont permis d'obtenir des titres élevés de virus recombinants :  $10^{11}$  génomes par ml. Ce procédé permet donc de produire des quantités très élevées d'AAV

25 recombinants (les procédés décrits dans l'art antérieur conduisent à des titres 10 à 100 fois inférieurs), ayant des qualités propres à un usage thérapeutique chez l'homme. En outre, il est très facile d'utiliser des quantités de cellules 10 fois plus importantes, et donc d'obtenir un titre en virus plus élevé.

LISTE DE SEQUENCES

5

## (1) INFORMATIONS GENERALES:

## (i) DEPOSANT:

- 10 (A) NOM: RHONE POULENC RORER  
(B) RUE: 20 AVENUE RAYMOND ARON  
(C) VILLE: ANTONY CEDEX  
(E) PAYS: FRANCE  
(F) CODE POSTAL: 92165  
15 (G) TELEPHONE: 40.91.69.22  
(H) TELECOPIE: 40.91.72.91

(ii) TITRE DE L'INVENTION: CELLULES POUR LA PRODUCTION D'ADENOVIRUS  
RECOMBINANTS

20

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES:8

## (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- 25 (A) TYPE DE SUPPORT: Tape  
(B) ORDINATEUR: IBM PC compatible  
(C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS  
(D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

30

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 20 paires de bases  
35 (B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADnc

40

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

AAGCAGCCAA GGGTTGTTT  
45

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 50 (A) LONGUEUR: 20 paires de bases  
(B) TYPE: nucléotide  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

55

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADnc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

ACCCTAGTAT TCAACCTGCC

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 20 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

ATCATCACAA GAGCGGAACG

20

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 3189 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: double

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

CATCCTCTTA CACTTTTTCA TACATTGCCC AAGAATAAAG AATCGTTTGT GTTATGTTTC 60

AACGTGTTTA TTTTTC AATT GCAGAAAATT TCAAGTCATT TTTCATTCAG TAGTATAGCC 120

CCACCACCAC ATAGCTTATA CAGATCACCG TACCTTAATC AAACCTCACAG AACCCTAGTA 180

TTCAACCTGC CACCTCCCTC CCAACACACA GAGTACACAG TCCTTTCTCC CCGGCTGGCC 240

TTAAAAAGCA TCATATCATG GGTAACAGAC ATATTCTTAG GTGTTATATT CCACACGGTT 300

TCCTGTCGAG CCAAACGCTC ATCAGTGATA TTAATAAACT CCCCAGGCGAG CTCACTTAAG 360

TTCATGTCGC TGTCCAGCTG CTGAGCCACA GGCTGCTGTC CAACTTGCGG TTGCTTAACG 420

GGCGGCGAAG GAGAAGTCCA CGCCTACATG GGGGTAGAGT CATAATCGTG CATCAGGATA 480

GGCGGGTGGT GCTGCAGCAG CGCGCGAATA AACTGCTGCC GCGGCGGCTC CGTCCTGCAG 540

	GAATACAACA	TGGCAGTGGT	CTCCTCAGCG	ATGATTGCGA	CGGCGCGCAG	CATAAGGCGC	600
5	CTTGTCTCTC	GGGCACAGCA	GCGCACCTTG	ATCTCACTTA	AATCAGCACA	GTAAGTGCAG	660
	CACAGCACCA	CAATATTGTT	CAAAATCCCA	CAGTGCAAGG	CGCTGTATCC	AAAGCTCATG	720
	GCGGGGACCA	CAGAACCCAC	GTGGCCATCA	TACCACAAGC	GCAGGTAGAT	TAAAGTGGGA	780
10	CCCCTCATAA	ACACGCTGGA	CATAAACATT	ACCTCTTTTG	GCATGTTGTA	ATTCACCACC	840
	TCCCGGTACC	ATATAAACCT	CTGATTAAAC	ATGGCGCCAT	CCACCACCAT	CCTAAACCAG	900
15	CTGGCCAAAA	CCTGCCCCGC	GGCTATACAC	TGCAGGGAAC	CGGGACTGGA	ACAATGACAG	960
	TGGAGAGCCC	AGGACTCGTA	ACCATGGATC	ATCATGCTCG	TCATGATATC	AATGTTGGCA	1020
	CAACACAGGC	ACACGTGCAT	ACACTTCCTC	AGGATTACAA	GCTCCTCCCG	CGTTAGAACC	1080
20	ATATCCCAGG	GAACAACCCA	TTCCTGAATC	AGCGTAAATC	CCACACTGCA	GGGAAGACCT	1140
	CGCACGTAAC	TCACGTTGTG	CATTGTCAAA	GTGTTACATT	CGGCGCAGCAG	CGGATGATCC	1200
25	TCCAGTATGG	TAGCGCGGGT	TTCTGTCTCA	AAAGGAGGTA	GACGATCCCT	ACTGTACGGA	1260
	GTGCGCCGAG	ACAACCGAGA	TCGTGTTGGT	CGTAGTGTCA	TGCCAAATGG	AACGCCGGAC	1320
	GTAGTCATAT	TTCCTGAAGC	AAAACCAGGT	GCGGGCGTGA	CAAACAGATC	TGCGTCTCCG	1380
30	GTCTCGCCGC	TTAGATCGCT	CTGTGTAGTA	GTTGTAGTAT	ATCCACTCTC	TCAAAGCATC	1440
	CAGGCGCCCC	CTGGCTTCGG	GTTCTATGTA	AACTCCTTCA	TCCGCGCGTG	CCCTGATAAC	1500
35	ATCCACCACC	GCAGAATAAG	CCACACCCAG	CCAACCTACA	CATTGCTTCT	GCGAGTCACA	1560
	CACGGGAGGA	GCGGGAAGAG	CTGGAAGAAC	CATGTTTTTT	TTTTTATTCC	AAAAGATTAT	1620
	CCAAAACCTC	AAAATGAAGA	TCTATTAAGT	GAACGCGCTC	CCCTCCGGTG	GCGTGGTCAA	1680
40	ACTCTACAGC	CAAAGAACAG	ATAATGGCAT	TTGTAAGATG	TTGCACAATG	GCTTCCAAAA	1740
	GGCAAACGGC	CCTCACGTCC	AAGTGGACGT	AAAGGCTAAA	CCCTTCAGGG	TGAATCTCCT	1800
45	CTATAAACAT	TCCAGCACCT	TCAACCATGC	CCAAATAATT	CTCATCTCGC	CACCTTCTCA	1860
	ATATATCTCT	AAGCAAATCC	CGAATATTAA	GTCCGGCCAT	TGTAAAAATC	TGCTCCAGAG	1920
	CGCCCTCCAC	CTTCAGCCTC	AAGCAGCGAA	TCATGATTGC	AAAAATTGAG	GTTCTTCACA	1980
50	GACCTGTATA	AGATTCAAAA	GCGGAACATT	AACAAAAATA	CCGCGATCCC	GTAGGTCCCT	2040
	TCGCAAGGCC	AGCTGAACAT	AATCGTGCAG	GTCTGCACGG	ACCAGCGCGG	CCACTTCCCC	2100
55	GCCAGGAACC	ATGACAAAAAG	AACCCACACT	GATTATGACA	CGCATACTCG	GAGCTATGCT	2160
	AACCAGCGTA	GCCCCGATGT	AAGCTTGTTG	CATGGGCGGC	GATATAAAAT	GCAAGGTGCT	2220
	GCTCAAAAAA	TCAGGCCAAG	CCTCGCGCAA	AAAAGAAAGC	ACATCGTAGT	CATGCTCATG	2280



	CAGATAAAGG CAGGTAAGCT CCGGAACCAC CACAGAAAAA GACACCATT TCTCTCAAA	2340
	CATGTCTGCG GGTTCCTGCA TAAACACAAA ATAAATAAC AAAAAACAT TTAAACATTA	2400
5	GAAGCCTGTC TTACAACAGG AAAACAACC CTTATAAGCA TAAGACGGAC TACGGCCATG	2460
	CCGGCGTGAC CGTAAAAAAA CTGGTCACCG TGATTAAAAA GCACCACCGA CAGCTCCTCG	2520
10	GTCATGTCCG GAGTCATAAT GTAAGACTCG GTAAACACAT CAGGTTGATT CACATCGGTC	2580
	AGTGCTAAAA AGCGACCGAA ATAGCCCGGG GGAATACATA CCCGCAGGCG TAGAGACAAC	2640
	ATTACAGCCC CCATAGGAGG TATAACAAAA TTAATAGGAG AGAAAAACAC ATAAACACCT	2700
15	GAAAAACCCT CCTGCCTAGG CAAAATAGCA CCCTCCCGCT CCAGAACAAC ATACAGCGCT	2760
	TCCACAGCGG CAGCCATAAC AGTCAGCCTT ACCAGTAAAA AAGAAAACCT ATTAAAAAAA	2820
20	CACCACTCGA CACGGCACCA GCTCAATCAG TCACAGTGTA AAAAAGGGCC AAGTGCAGAG	2880
	CGAGTATATA TAGGACTAAA AAATGACGTA ACGGTTAAAG TCCACAAAAA ACACCCAGAA	2940
	AACCGCACGC GAACCTACGC CCAGAAACGA AAGCCAAAAA ACCCACAAC TCCCTCAAATC	3000
25	GTCACTTCCG TTTTCCCACG TTACGTCCTT TCCCATTTTA AGAAACTAC AATTCCCAAC	3060
	ACATACAAGT TACTCCGCCC TAAAACCTAC GTCACCCGCC CCGTTCCAC GCCCGCGGCC	3120
30	ACGTCACAAA CTCACCCCC TCATTATCAT ATGGGCTTCA ATCCAAAATA AGGTATATTA	3180
	TTGATGATG	3189

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:

35

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 48 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: double
- (D) CONFIGURATION: linéaire

40

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

45

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

50

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

GGGCCCCGCG CCACCATGGA TATTGAACCT GAAGTGTTAT ATGCAGGA

48 -

55

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 39 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: double  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

CTCGAGAACG CCGGACGTAG TCTTTTGATG AAACAGAAG 39

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 1884 paires de bases  
 (B) TYPE: nucléotide  
 (C) NOMBRE DE BRINS: double  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

ATGGATATTG AACCTGAAGT GTTATATGCA GGATATGATA GCTCTGTTCC AGACTCAACT 60

TGGAGGATCA TCACTACGCT CAACATGTTA GGAGGGCGGC AAGTGATTGC AGCAGTGAAA 120

TGGGCAAAGG CAATACCAGG TTTCAGGAAC TTACACCTGG ATGACCAAAT GACCCTACTG 180

CAGTACTCCT GGATGTTTCT TATGGCATTG GCTCTGGGGT GGAGATCATA TAGACAATCA 240

AGTGCAAACC TGCTGTGTTT TGCTCCTGAT CTGATTATTA ATGAGCAGAG AATGACTCTA 300

CCCTGCATGT ACGACCAATG TAAACACATG CTGTATGTTT CCTCTGAGTT ACACAGGCTT 360

CAGGTATCTT ATGAAGAGTA TCTCTGTATG AAAACCTTAC TGCTTCTCTC TTCAGTTCCT 420

AAGGACGGTC TGAAGAGCCA AGAGCTATTT GATGAAATTA GAATGACCTA CATCAAAGAG 480

CTAGGAAAAG CCATTGTCAA GAGGGAAGGA AACTCCAGCC AGAACTGGCA GCGGTTTTAT 540

CAACTGACAA AACTCTTGGA TTCTATGCAT GAAGTGGTTG AAAATCTCCT TAACTATTGC 600

TTCCAAACAT TTTTGGATAA GACCATGAGT ATTGAATTCC CCGAGATGTT AGCTGAAATC 660

ATCACCAATC AGATACCAA ATATTCAAAT GGAAATATCA AAAAATTCTT GTTTCATCAA 720

AAGACTACGT CCGGCGTTCC ATTTGGCATG AACTACGAC CAACACGATC TCGGTTGTCT 780

CGGCGCACTC CGTACAGTAG GGATCGTCTA CCTCCTTTTG AGACAGAAAC CCGCGCTACC 840  
 ATACTGGAGG ATCATCCGCT GCTGCCCGAA TGTAACACTT TGACAATGCA CAACGTGAGT 900  
 5 TACGTGCGAG GTCTTCCCTG CAGTGTGGGA TTTACGCTGA TTCAGGAATG GGTGTGTTCC 960  
 TGGGATATGG TTCTAACGCG GGAGGAGCTT GTAATCCTGA GGAAGTGTAT GCACGTGTGC 1020  
 10 CTGTGTTGTG CCAACATTGA TATCATGACG AGCATGATGA TCCATGGTTA CGAGTCCTGG 1080  
 GCTCTCCACT GTCATTGTTC CAGTCCCGGT TCCCTGCAGT GTATAGCCGG CGGGCAGGTT 1140  
 TTGGCCAGCT GGTTTAGGAT GGTGGTGGAT GCGCCCATGT TTAATCAGAG GTTTATATGG 1200  
 15 TACCGGGAGG TGGTGAATTA CAACATGCCA AAAGAGGTAA TGTTTATGTC CAGCGTGTTC 1260  
 ATGAGGGGTC GCCACTTAAT CTACCTGCGC TTGTGGTATG ATGGCCACGT GGGTTCTGTG 1320  
 20 GTCCCCGCCA TGAGCTTTGG ATACAGCGCC TTGCACTGTG GGATTTTGAA CAATATTGTG 1380  
 GTGCTGTGCT GCAGTTACTG TGCTGATTTA AGTGAGATCA GGGTGCGCTG CTGTGCCCGG 1440  
 AGGACAAGGC GCCTTATGCT GCGGGCGGTG CGAATCATCG CTGAGGAGAC CACTGCCATG 1500  
 25 TTGTATTCCT GCAGGACGGA GCGGCGGCGG CAGCAGTTTA TTCGCGCGCT GCTGCAGCAC 1560  
 CACCGCCCTA TCCTGATGCA CGATTATGAC TCTACCCCCA TGTAGGCGTG GACTTCTCCT 1620  
 30 TCGCCGCCCG TTAAGCAACC GCAAGTTGGA CAGCAGCCTG TGGCTCAGCA GCTGGACAGC 1680  
 GACATGAACT TAAGTGAGCT GCCCGGGGAG TTTATTAATA TCACTGATGA GCGTTTGGCT 1740  
 CGACAGGAAA CCGTGTGGAA TATAACACCT AAGAATATGT CTGTTACCCA TGATATGATG 1800  
 35 CTTTTTAAGG CCAGCCGGGG AGAAAGGACT GTGTACTCTG TGTGTTGGGA GGGAGGTGGC 1860  
 AGGTTGAATA CTAGGTTTCT GTGA 1884

40 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
 (A) LONGUEUR: 534 acides aminés  
 45 (B) TYPE: acide aminé  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

50 (ii) TYPE DE MOLECULE: PROTEINE

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

55 Met Asp Ile Glu Pro Glu Val Leu Tyr Ala Gly Tyr Asp Ser Ser Val  
 1 5 10 15  
 Pro Asp Ser Thr Trp Arg Ile Met Thr Thr Leu Asn Met Leu Gly Gly  
 20 25 30

42

	Arg	Gln	Val	Ile	Ala	Ala	Val	Lys	Trp	Ala	Lys	Ala	Ile	Phe	Gly	Phe
			35					40					45			
5	Arg	Asn	Leu	His	Leu	Asp	Asp	Gln	Met	Thr	Leu	Leu	Gln	Tyr	Ser	Trp
		50				55						60				
	Met	Phe	Leu	Met	Ala	Phe	Ala	Leu	Gly	Trp	Arg	Ser	Tyr	Arg	Gln	Ser
	65					70					75					80
10	Ser	Ala	Asn	Leu	Leu	Cys	Phe	Ala	Pro	Asp	Leu	Ile	Ile	Asn	Glu	Gln
					85					90					95	
	Arg	Met	Thr	Leu	Pro	Cys	Met	Tyr	Asp	Gln	Cys	Lys	His	Met	Leu	Tyr
15				100					105					110		
	Val	Ser	Ser	Glu	Leu	His	Arg	Leu	Gln	Val	Ser	Tyr	Glu	Glu	Tyr	Leu
			115					120					125			
20	Cys	Met	Lys	Thr	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Ser	Val	Pro	Lys	Asp	Gly	Leu
		130					135					140				
	Lys	Ser	Gln	Glu	Leu	Phe	Asp	Glu	Ile	Arg	Met	Thr	Tyr	Ile	Lys	Glu
	145					150					155					160
25	Leu	Gly	Lys	Ala	Ile	Val	Lys	Arg	Glu	Gly	Asn	Ser	Ser	Gln	Asn	Trp
					165					170					175	
	Gln	Arg	Phe	Tyr	Gln	Leu	Thr	Lys	Leu	Leu	Asp	Ser	Met	His	Glu	Val
30				180					185					190		
	Val	Glu	Asn	Leu	Leu	Asn	Tyr	Cys	Phe	Gln	Thr	Phe	Leu	Asp	Lys	Thr
			195					200					205			
35	Met	Ser	Ile	Glu	Phe	Pro	Glu	Met	Leu	Ala	Glu	Ile	Ile	Thr	Asn	Gln
		210					215					220				
	Ile	Pro	Lys	Tyr	Ser	Asn	Gly	Asn	Ile	Lys	Lys	Leu	Leu	Phe	His	Gln
	225					230					235					240
40	Lys	Thr	Thr	Ser	Gly	Val	Pro	Phe	Gly	Met	Thr	Leu	Arg	Pro	Thr	Arg
					245					250					255	
	Ser	Arg	Leu	Ser	Arg	Arg	Thr	Pro	Tyr	Ser	Arg	Asp	Arg	Leu	Pro	Pro
45				260					265					270		
	Phe	Glu	Thr	Glu	Thr	Arg	Ala	Thr	Ile	Leu	Glu	Asp	His	Pro	Leu	Leu
			275					280					285			
50	Pro	Glu	Cys	Asn	Thr	Leu	Thr	Met	His	Asn	Val	Ser	Tyr	Val	Arg	Gly
		290					295					300				
	Leu	Pro	Cys	Ser	Val	Gly	Phe	Thr	Leu	Ile	Gln	Glu	Trp	Val	Val	Pro
	305					310					315					320
55	Trp	Asp	Met	Val	Leu	Thr	Arg	Glu	Glu	Leu	Val	Ile	Leu	Arg	Lys	Cys
					325					330					335	
	Met	His	Val	Cys	Leu	Cys	Cys	Ala	Asn	Ile	Asp	Ile	Met	Thr	Ser	Met
				340					345					350		

[illegible]

## REVENDICATIONS

1. Cellule utilisable pour la production d'adénovirus défectifs caractérisée en ce qu'elle comprend, insérée dans son génome, une partie de la région E4 d'un génome d'adénovirus portant la phase de lecture ORF6 sous contrôle d'un promoteur fonctionnel.  
5
2. Cellule selon la revendication 1 caractérisée en ce la partie de la région E4 comprend les phases de lecture ORF6 et ORF6/7
3. Cellule selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce que la partie de la région E4 est issue d'un génome d'adénovirus humain du groupe C.
- 10 4. Cellule selon la revendication 3 caractérisée en ce que la région E4 est issue du génome d'un adénovirus Ad2 ou Ad5.
5. Cellule selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que le promoteur est un promoteur inductible.
- 15 6. Cellule selon la revendication 5 caractérisée en ce que le promoteur est choisi parmi le promoteur MMTV et ses dérivés.
7. Cellule selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 caractérisée en ce que la partie de la région E4 comprend la phase de lecture ORF6 fusionnée en phase traductionnelle avec le domaine d'un récepteur nucléaire qui est responsable de la reconnaissance de son ligand spécifique.
- 20 8. Cellule selon la revendication 7 caractérisée en ce qu'il s'agit du domaine de fixation de l'hormone du récepteur aux glucocorticoïdes (HBD-GCR).
9. Cellule selon la revendication 8 caractérisée en ce que la phase de lecture ORF6 fusionnée en phase traductionnelle avec le domaine d'un récepteur nucléaire responsable de la reconnaissance de son ligand spécifique est placé sous contrôle d'un  
25 promoteur inductible qui répond aux glucocorticoïdes.
10. Cellule selon la revendication 9 caractérisée en ce qu'il s'agit du promoteur GRE5.

11. Cellule selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle dérive d'une cellule qui transcomplémente pour la région E1.

12. Cellule selon la revendication 11 caractérisée en ce qu'elle dérive de la lignée cellulaire 293.

5 13. Cellule selon l'une des revendications 1 à 10 caractérisée en ce qu'elle dérive des cellules KB, Hela, MDCK, Véro ou gmDBP6.

14. Cellule selon l'une des revendications 1 à 10 caractérisée en ce qu'elle dérive d'une culture de cellules primaires.

10 15. Cellule utilisable pour la production d'adénovirus défectifs caractérisée en ce qu'elle comprend, inséré dans son génome, un fragment BglII-BglII correspondant aux nucléotides 34115-32490 du génome de l'Ad5.

16. Cellule selon la revendication 15 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de la lignée 293.

15 17. Cellule selon la revendication 15 ou 16 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de la lignée 293 transformée par le plasmide pORF6Gen.

18. Cellule utilisable pour la production d'adénovirus défectifs caractérisée en ce qu'elle comprend, inséré dans son génome, un fragment BglII-PvuII correspondant aux nucléotides 34115-33126 du génome de l'Ad5.

20 19. Cellule utilisable pour la production d'adénovirus défectifs caractérisée en ce qu'elle comprend, inséré dans son génome, un gène chimérique comprenant la phase de lecture ORF6 du génome d'un adénovirus fusionnée, à l'une de ses extrémités, au domaine de liaison de l'hormone du récepteur aux glucocorticoïdes.

20. Cellule selon la revendication 19 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de la lignée 293 transformée par le plasmide pGG0

25 21. Plasmide comprenant une partie de la région E4 d'un génome d'adénovirus portant la phase de lecture ORF6 sous contrôle d'un promoteur inductible.

22. Plasmide selon la revendication 21 caractérisé en ce que la partie de la région E4 du génome d'adénovirus porte les phases de lecture ORF6 et ORF6/7.

23. Plasmide selon la revendication 22 caractérisé en ce qu'il s'agit du plasmide pORF6Gen

24. Plasmide selon la revendication 21 caractérisé en ce que la phase de lecture ORF6 est fusionnée en phase traductionnelle avec le domaine d'un récepteur nucléaire  
5 responsable de la reconnaissance de son ligand spécifique

25. Plasmide selon la revendication 24 caractérisé en ce qu'il s'agit du plasmide pGG0.

26. Utilisation d'une cellule selon l'une des revendications 1 à 20 pour la production d'adénovirus recombinants défectifs au moins pour la région E4.

10 27. Procédé de production d'adénovirus recombinants défectifs au moins pour la région E4 caractérisé en ce que l'on transforme une culture de cellules selon l'une des revendications 1 à 20 avec un ou plusieurs plasmides apportant les différentes régions du génome dudit adénovirus recombinant défectif puis on récolte les virus produits.

15 28. Procédé selon la revendication 27 pour la production d'adénovirus recombinants défectifs pour les régions E1 et E4.

29. Procédé selon la revendication 27 ou 28 caractérisé en ce que la culture de cellules est une culture de cellules selon l'une des revendications 15 à 20.

20 30. Stock d'adénovirus recombinant défectifs purifié obtenu selon le procédé des revendications 27 à 29.

31. Adénovirus recombinant défectif  $\Delta E1, ORF3^-, ORF6^-$  comprenant une délétion de tout ou partie de la région E1 et des nucléotides 34801-34329 et 34115-33126 de la région E4.

25 32. Adénovirus recombinant défectif  $\Delta E1, \Delta E4, ORF1^+$  comprenant une délétion de tout ou partie de la région E1 et une délétion de la région E4 à l'exception de la phase de lecture ORF1.

33. Adénovirus recombinant défectif selon la revendication 32 caractérisé en ce qu'il comprend une délétion dans la région E1 et une délétion d'un fragment dont



l'extrémité 5' est comprise dans la phase de lecture ORF7 et dont l'extrémité 3' est située dans la phase de lecture ORF2.

34. Adénovirus recombinant défectif selon la revendication 33 caractérisé en ce qu'il comprend une délétion dans la région E4 couvrant les nucléotides 33093 à 35053.

5        35. Adénovirus recombinant défectif  $\Delta E1, \Delta E4, ORF4^+$  comprenant une délétion de tout ou partie de la région E1 et une délétion de la région E4 à l'exception de la phase de lecture ORF4.

10       36. Adénovirus recombinant défectif selon la revendication 35 caractérisé en ce qu'il comprend une délétion dans la région E1, une délétion d'un fragment dont l'extrémité 5' est comprise dans la phase de lecture ORF7 et dont l'extrémité 3' est située dans la phase de lecture ORF6, et une délétion d'un fragment dont l'extrémité 5' est comprise dans la phase de lecture ORF3 et dont l'extrémité 3' est située dans la phase de lecture ORF1 ou dans la région promotrice de E4.

15       37. Adénovirus recombinant défectif selon la revendication 36 caractérisé en ce qu'il comprend une délétion dans la région E1, une délétion couvrant les nucléotides 33093(SmaI)-33695 et une délétion couvrant les nucléotides 34634-35355(SmaI).

20       38. Adénovirus recombinant défectif  $\Delta E1, \Delta E4$  comprenant une délétion de tout ou partie de la région E1 et une délétion couvrant la totalité de la région E4, choisie parmi les délétions suivantes : nucléotides 32720-35835, ou 33466-35355 ou 33093-35355.

39. Utilisation d'une cellule selon l'une des revendications 1 à 20 pour la production d'AAV recombinants.

25       40. Utilisation selon la revendication 39 d'une cellule comprenant, insérée dans son génome, tout ou une partie de la région E4 du génome d'un adénovirus comportant au moins la phase de lecture ORF6.

41. Procédé de production d'AAV recombinants caractérisé en ce que l'on introduit dans une culture de cellules comprenant, insérées dans leur génome, une partie de la région E4 du génome d'un adénovirus comportant au moins la phase de lecture ORF6 :

- un plasmide AAV portant un acide nucléique d'intérêt bordé d'ITRs d'AAV,
  - un adénovirus helper, et,
  - les fonctions Rep et Cap de l'AAV,
- puis on récolte les virus produits.

5           42. Procédé selon la revendication 41 caractérisé en ce que la culture de cellules est une culture de cellules comportant l'intégralité de la région E4.

          43. Procédé selon la revendication 41 caractérisé en ce que la culture de cellules est une culture de cellules comportant la phase de lecture ORF6 et éventuellement la phase de lecture ORF6/7.

10           44. Procédé selon la revendication 43 caractérisé en ce que la culture de cellules est une culture de cellules telles que définies dans les revendications 1 à 20.

          45. Procédé selon la revendication 41 caractérisé en ce que l'adénovirus helper est un adénovirus humain défectif pour la région E4.

15           46. Procédé selon la revendication 45 caractérisé en ce que l'adénovirus helper est un adénovirus humain défectif pour les régions E1 et E4.

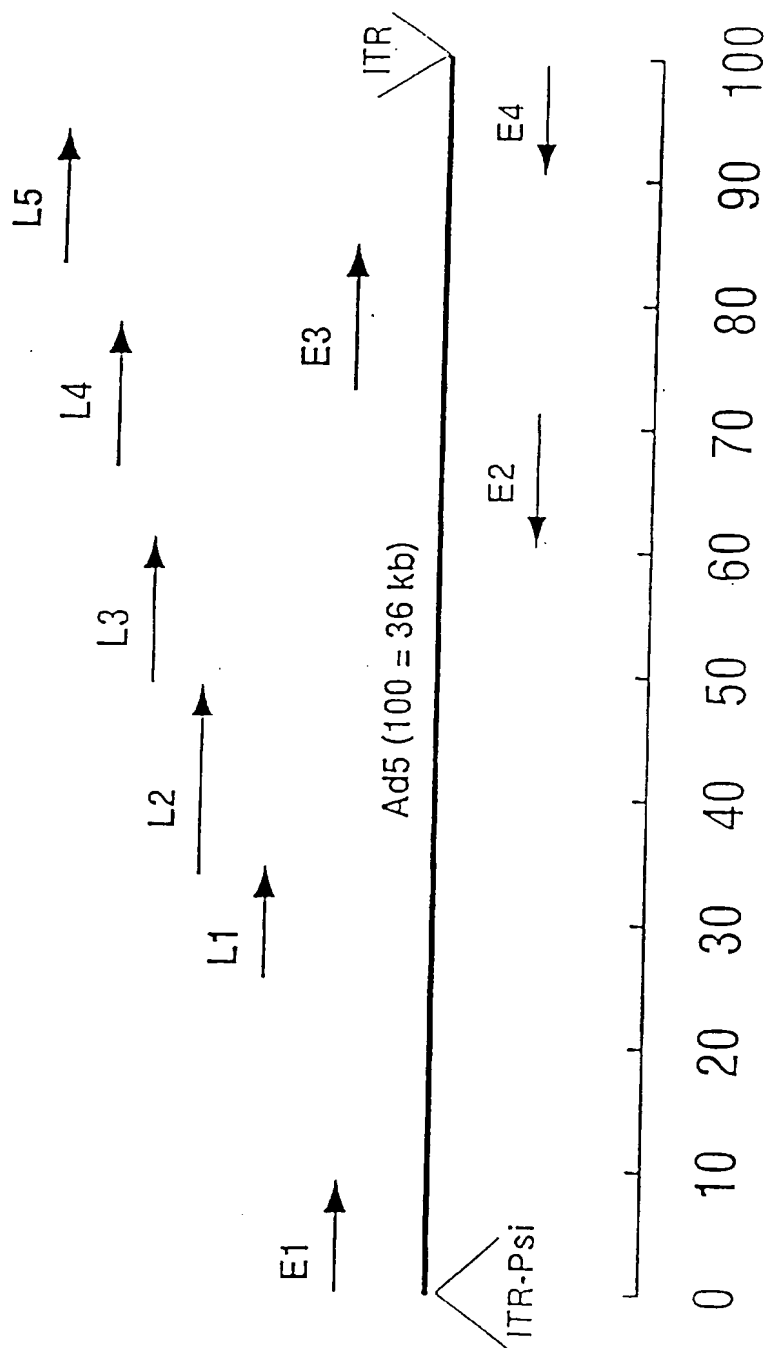
          47. Procédé selon la revendication 41 caractérisé en ce que l'adénovirus helper défectif est un adénovirus canin, de préférence choisi parmi les souches CAV2.

20           48. Procédé selon la revendication 41 caractérisé en ce que les fonctions rep et cap sont apportées par co-transfection des cellules avec un plasmide portant les régions rep et cap de l'AAV.

          49. Procédé selon la revendication 41 caractérisé en ce que les plasmides sont transfectés en présence d'un agent compactant les acides nucléiques et d'un lipide cationique.

25           50. Procédé de production d'AAV recombinants caractérisé en ce que, dans une culture de cellules transcomplémentant des fonctions E1 et E4 de l'adénovirus, on cotransfecte en présence d'un lipide polycationique et d'un agent compactant un plasmide AAV portant un acide nucléique d'intérêt bordé d'ITRs d'AAV et un

plasmide portant les régions rep et cap de l'AAV; on co-infecte ladite culture avec un adénovirus helper choisi parmi les adénovirus humains d'origine Ad2 ou Ad5 défectifs pour les régions E1 et E4 et les adénovirus canins d'origine CAV2, puis on récolte les virus produits.



**Figure 1**

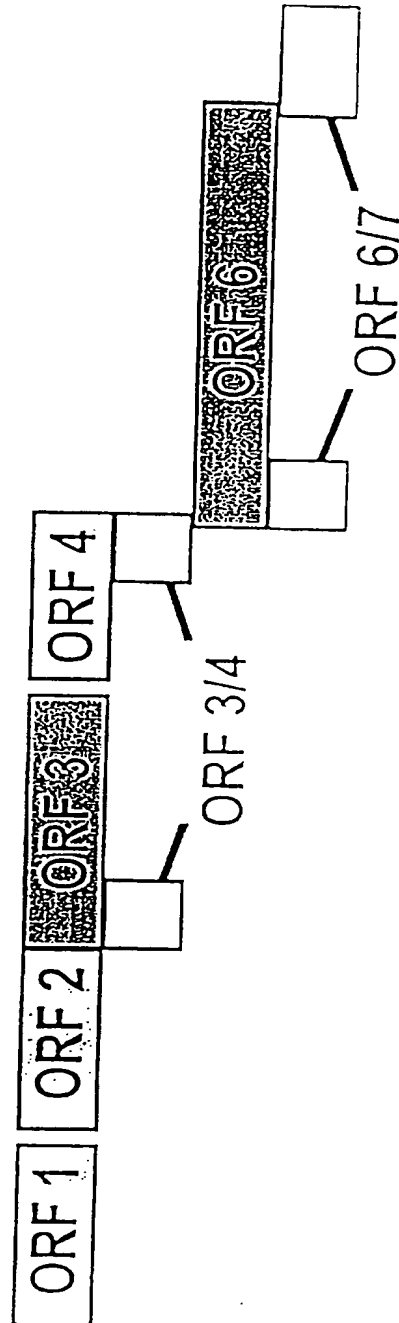


Figure 2

3/7

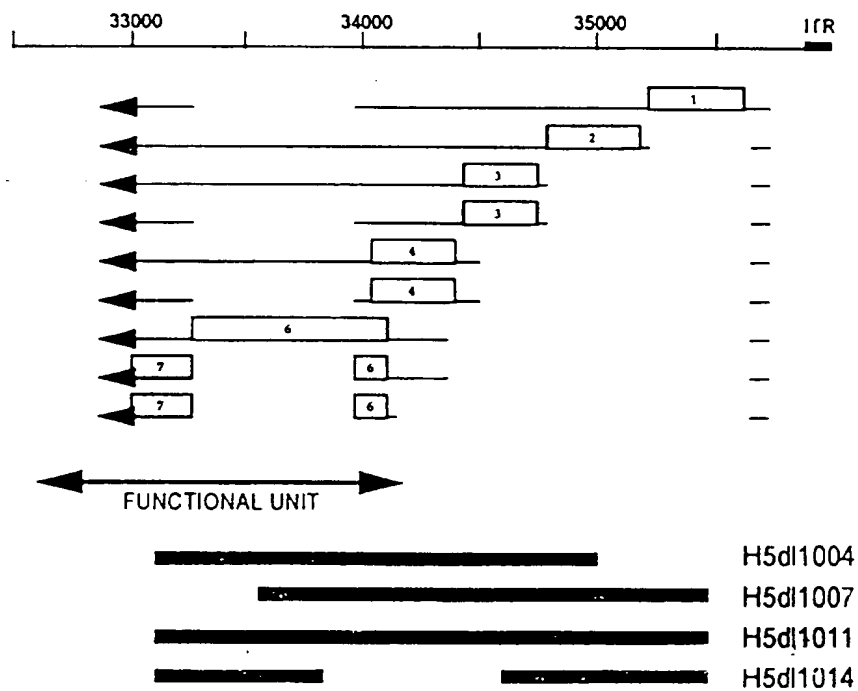


Figure 3

4/7

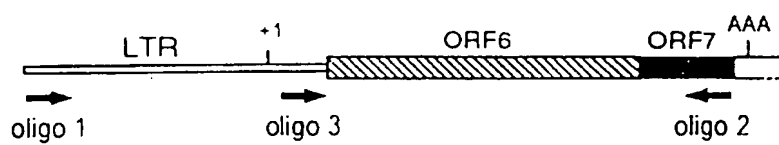


Figure 4A

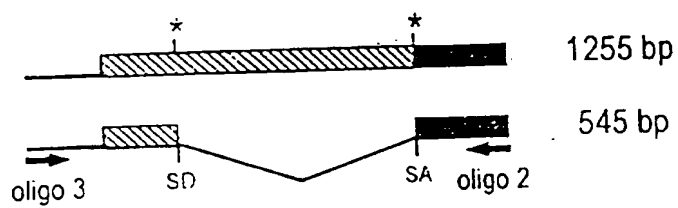


Figure 4B

E4 DELETION INFLUENCES  
FIBER GENE EXPRESSION

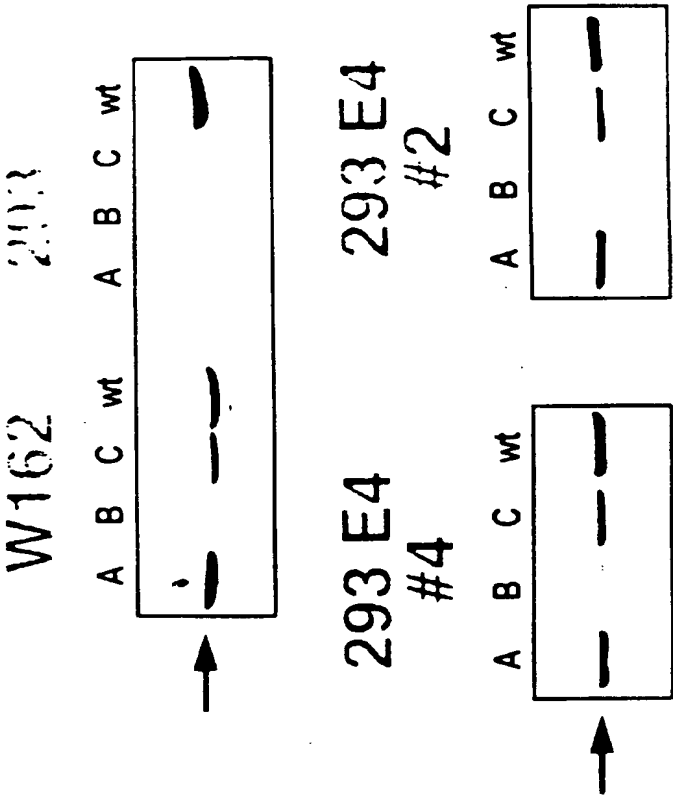


Figure 5



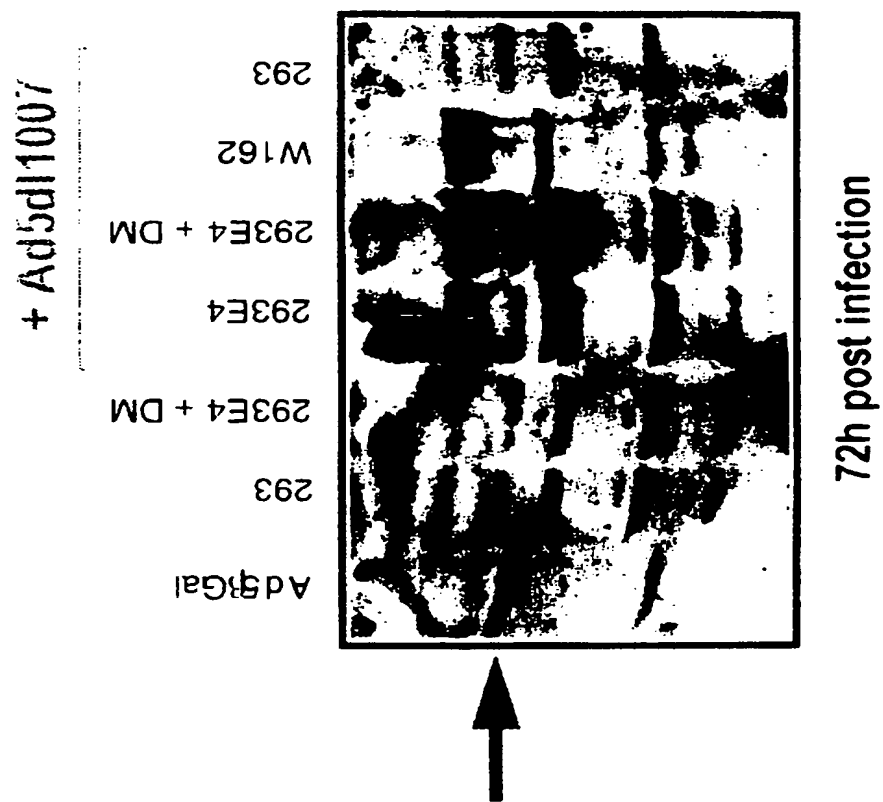


Figure 6

7/7

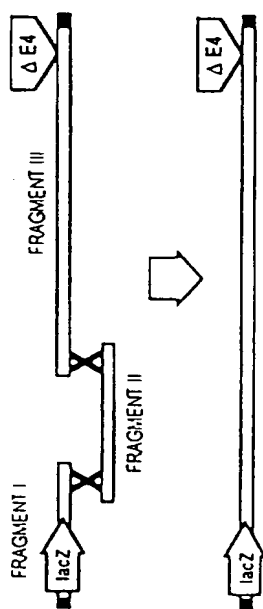


Figure 7

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No  
PCT/FR 96/00088

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N15/86 C12N15/34 C12N5/10 C12N7/04 C07K14/075

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO,A,95 02697 (RHONE-POULENC RORER S.A.) 26 January 1995	1-6, 11-14, 26-30
P,Y	cited in the application see page 21, line 20 - line 26; claims 1-28	15-18,38
X	--- NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 17, no. 8, 1989, IRL PRESS LIMITED, OXFORD, ENGLAND, pages 3037-3048, XP002003252 G. KETNER ET AL.: "Complementation of adenovirus E4 mutants by transient expression of E4 cDNA and deletion plasmids"	21-23, 26,27
Y	see page 3046, line 11 - line 17 --- -/-	1-6, 11-18, 28-30,38

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 May 1996

Date of mailing of the international search report

04.06.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No  
PCT/FR 96/00088

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO,A,94 28152 (TRANSGENE) 8 December 1994 see page 13, line 29 - line 33; claim 40; figures 1-11  see page 13, line 19 - line 21 ---	38 1-6, 11-18, 21-23, 26-30
X	VIROLOGY, vol. 194, 1993, ACADEMIC PRESS, INC.,NEW YORK, US, pages 50-58, XP002003253 K. ÖHMAN ET AL.: "Two adenovirus proteins with redundant activities in virus growth facilities tripartite leader mRNA accumulations" see page 50, line 7 - line 10 see page 50, right-hand column, line 6 - page 51, left-hand column, line 40 ---	21-23
P,X	INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, vol. 6, no. 3, March 1995, NATIONAL HELENIC RES. FOUNDATION, ATHENS,GREECE, pages 663-668, XP000562776 K. ÖHMAN ET AL.: "Effect of adenovirus-2 early region 4 products on E1 transformation" see the whole document ---	21-23
P,Y	FR,A,2 707 664 (CNRS) 20 January 1995  see page 7, line 26 - page 10, line 12 ---	1-6, 11-18, 21-23, 26-30,38
Y	WO,A,94 12649 (GENZYME CORPORATION) 9 June 1994  see page 18, line 6 - line 19 see page 58, line 30 - line 34 ---	1-6, 11-18, 21-23, 26-30,38
Y	VIROLOGY, vol. 193, no. 2, ACADEMIC PRESS, INC.,NEW YORK, US, pages 794-801, XP002003255 E. BRIDGE ET AL.: "Adenovirus early region 4 and viral DNA synthesis" cited in the application see page 799, right-hand column, line 40 - page 800, left-hand column, line 4 ---	1-6, 11-18, 21-23, 26-30,38
	-/--	

1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.  
PCT/FR 96/00088

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DNA, vol. 8, no. 2, 1989, MARY ANN LIEBERT, INC., PUBLISHERS, NEW YORK, US, pages 127-133, XP000565540 M.S.H. KO AND T. TAKANO: "A highly inducible system of gene expression by positive feedback production of glucocorticoid receptors" see the whole document ---	7-10, 19, 20, 24, 25
A	J. VIROLOGY, vol. 65, no. 3, AM.SOC.MICROBIOL., WASHINGTON, US, pages 1440-1449, XP002003256 C. HEMSTRÖM ET AL.: "Adenovirus E4-dependent activation of the early E2 promoter is insufficient to promote early-to-late-phase transition" en entier ---	1-38
A	J. VIROLOGY, vol. 57, no. 3, AM.SOC.MICROBIOL., WASHINGTON, US, pages 833-838, XP002003257 D.H. WINBERGER AND G. KETNER: "Adenoviral region 4 is required for efficient viral DNA replication and for late gene expression" cited in the application en entier ---	1-38
A	J. VIROLOGY, vol. 63, no. 2, AM.SOC.MICROBIOL., WASHINGTON, US, pages 631-638, XP002003258 E. BRIDGE AND G. KETNER: "Redundant control of adenovirus late gene expression" cited in the application see page 637, left-hand column, line 13 - right-hand column, line 12 ---	1-38
A	PROC. NATL.ACAD SCI., vol. 80, NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US;, pages 5383-5386, XP002003259 D.H. WEINBERG AND G. KETNER: "A cell line that supports the growth of a defective early region 4 deletion mutant of adenovirus type 2" cited in the application en entier ---	1-38

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/FR 96/00088

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BRITISH MEDICAL BULLETIN, vol. 51, no. 1, January 1995, THE BRITISH COUNCIL, UK, pages 31-44, XP002003260 E.J. KREMER AND M. PERRICAUDET: "Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer" see the whole document ---	39-50
P,A	MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, vol. 3, no. 1, - February 1995 HUMANA PRESS INC., US, pages 9-15, XP002003261 F. ROLLING AND R.J. SAMULSKI: "AAV as a viral vector for human gene therapy" see the whole document ---	39-50
P,A	WO,A,95 20671 (RHONE-POULENC RORER SA ;DESCAMPS VINCENT (FR); PERRICAUDET MICHEL) 3 August 1995 see the whole document ---	39-50
P,A	WO,A,95 06743 (UAB RESEARCH FOUNDATION) 9 March 1995 see the whole document ---	39-50
P,A	WO,A,95 23867 (RHONE-POULENC RORER) 8 September 1995 see the whole document ---	39-50
T	JOURNAL OF VIROLOGY 70 (1). 1996. 559-565. ISSN: 0022-538X, January 1996, XP002003262 YEH P ET AL: "Efficient dual transcomplementation of adenovirus E1 and E4 regions from a 293-derived cell line expressing a minimal E4 functional unit." see the whole document ---	1-50
T	J. VIROLOGY, vol. 70, no. 5, May 1996, AM.SOC.MICROBIOL.,WASHINGTON,US, pages 3227-3234, XP002003300 F.K. FERRARI ET AL.: "Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vector" see the whole document -----	1-50

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/FR 96/00088

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9502697	26-01-95	FR-A- 2707664	20-01-95
		FR-A- 2718749	20-10-95
		AU-B- 7264694	13-02-95
		CA-A- 2144040	26-01-95
		CN-A- 1113390	13-12-95
		CZ-A- 9500639	15-11-95
		EP-A- 0667912	23-08-95
		FI-A- 951138	13-04-95
		JP-T- 8501703	27-02-96
		NO-A- 950939	10-03-95
		NZ-A- 269156	26-03-96
		PL-A- 308122	24-07-95
		ZA-A- 9405012	20-02-95
WO-A-9428152	08-12-94	FR-A- 2705686	02-12-94
		AU-B- 6850394	20-12-94
		CA-A- 2141212	08-12-94
		EP-A- 0652968	17-05-95
		JP-T- 7509616	26-10-95
FR-A-2707664	20-01-95	AU-B- 7264694	13-02-95
		CA-A- 2144040	26-01-95
		CN-A- 1113390	13-12-95
		CZ-A- 9500639	15-11-95
		EP-A- 0667912	23-08-95
		FI-A- 951138	13-04-95
		WO-A- 9502697	26-01-95
		JP-T- 8501703	27-02-96
		NO-A- 950939	10-03-95
		NZ-A- 269156	26-03-96
		PL-A- 308122	24-07-95
		ZA-A- 9405012	20-02-95
WO-A-9412649	09-06-94	AU-B- 5734994	22-06-94
		CA-A- 2145641	09-06-94
		EP-A- 0673431	27-09-95
WO-A-9520671	03-08-95	FR-A- 2716682	01-09-95
		AU-B- 1539595	15-08-95

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No  
PCT/FR 96/00088

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9506743	09-03-95	AU-B- 7565694	22-03-95
WO-A-9523867	08-09-95	FR-A- 2716893	08-09-95
		AU-B- 1852695	18-09-95



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der : Internationale No  
PCT/FR 96/00088

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 6 C12N15/86 C12N15/34 C12N5/10 C12N7/04 C07K14/075		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C12N C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	WO,A,95 02697 (RHONE-POULENC RORER S.A.) 26 Janvier 1995	1-6, 11-14, 26-30
P,Y	cité dans la demande voir page 21, ligne 20 - ligne 26; revendications 1-28	15-18,38
X	--- NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 17, no. 8, 1989, IRL PRESS LIMITED, OXFORD, ENGLAND, pages 3037-3048, XP002003252 G. KETNER ET AL.: "Complementation of adenovirus E4 mutants by transient expression of E4 cDNA and deletion plasmids"	21-23, 26,27
Y	voir page 3046, ligne 11 - ligne 17 --- -/-	1-6, 11-18, 28-30,38
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</span> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">20 Mai 1996</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">04.06.96</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Hornig, H</div>

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De l'Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle  
PCT/FR 96/00088

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X Y	WO,A,94 28152 (TRANSGENE) 8 Décembre 1994 voir page 13, ligne 29 - ligne 33; revendication 40; figures 1-11  voir page 13, ligne 19 - ligne 21 ---	38 1-6, 11-18, 21-23, 26-30
X	VIROLOGY, vol. 194, 1993, ACADEMIC PRESS, INC., NEW YORK, US, pages 50-58, XP002003253 K. ÖHMAN ET AL.: "Two adenovirus proteins with redundant activities in virus growth facilities tripartite leader mRNA accumulations" voir page 50, ligne 7 - ligne 10 voir page 50, colonne de droite, ligne 6 - page 51, colonne de gauche, ligne 40 ---	21-23
P,X	INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, vol. 6, no. 3, Mars 1995, NATIONAL HELENIC RES. FOUNDATION, ATHENS, GREECE, pages 663-668, XP000562776 K. ÖHMAN ET AL.: "Effect of adenovirus-2 early region 4 products on E1 transformation" voir le document en entier ---	21-23
P,Y	FR,A,2 707 664 (CNRS) 20 Janvier 1995  voir page 7, ligne 26 - page 10, ligne 12 ---	1-6, 11-18, 21-23, 26-30,38
Y	WO,A,94 12649 (GENZYME CORPORATION) 9 Juin 1994  voir page 18, ligne 6 - ligne 19 voir page 58, ligne 30 - ligne 34 ---	1-6, 11-18, 21-23, 26-30,38
Y	VIROLOGY, vol. 193, no. 2, ACADEMIC PRESS, INC., NEW YORK, US, pages 794-801, XP002003255 E. BRIDGE ET AL.: "Adenovirus early region 4 and viral DNA synthesis" cité dans la demande voir page 799, colonne de droite, ligne 40 - page 800, colonne de gauche, ligne 4 --- -/--	1-6, 11-18, 21-23, 26-30,38

1

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Des : Internationale No  
PCT/FR 96/00088

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Categorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	DNA, vol. 8, no. 2, 1989, MARY ANN LIEBERT, INC., PUBLISHERS, NEW YORK, US, pages 127-133, XP000565540 M.S.H. KO AND T. TAKANO: "A highly inducible system of gene expression by positive feedback production of glucocorticoid receptors" voir le document en entier ---	7-10, 19, 20, 24, 25
A	J. VIROLOGY, vol. 65, no. 3, AM.SOC.MICROBIOL., WASHINGTON, US, pages 1440-1449, XP002003256 C. HEMSTRÖM ET AL.: "Adenovirus E4-dependent activation of the early E2 promoter is insufficient to promote early-to-late-phase transition" en entier ---	1-38
A	J. VIROLOGY, vol. 57, no. 3, AM.SOC.MICROBIOL., WASHINGTON, US, pages 833-838, XP002003257 D.H. WINBERGER AND G. KETNER: "Adenoviral region 4 is required for efficient viral DNA replication and for late gene expression" cité dans la demande en entier ---	1-38
A	J. VIROLOGY, vol. 63, no. 2, AM.SOC.MICROBIOL., WASHINGTON, US, pages 631-638, XP002003258 E. BRIDGE AND G. KETNER: "Redundant control of adenovirus late gene expression" cité dans la demande voir page 637, colonne de gauche, ligne 13 - colonne de droite, ligne 12 ---	1-38
A	PROC. NATL.ACAD SCI., vol. 80, NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US,, pages 5383-5386, XP002003259 D.H. WEINBERG AND G. KETNER: "A cell line that supports the growth of a defective early region 4 deletion mutant of adenovirus type 2" cité dans la demande en entier ---	1-38
	-/--	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der. Internationale No  
PCT/FR 96/00088

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	BRITISH MEDICAL BULLETIN, vol. 51, no. 1, Janvier 1995, THE BRITISH COUNCIL, UK, pages 31-44, XP002003260 E.J. KREMER AND M. PERRICAUDET: "Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer" voir le document en entier ---	39-50
P,A	MOLECULAR BIOTECHNOLOGY, vol. 3, no. 1, - Février 1995 HUMANA PRESS INC., US, pages 9-15, XP002003261 F. ROLLING AND R.J. SAMULSKI: "AAV as a viral vector for human gene therapy" voir le document en entier ---	39-50
P,A	WO,A,95 20671 (RHONE-POULENC RORER SA ;DESCAMPS VINCENT (FR); PERRICAUDET MICHEL) 3 Août 1995 voir le document en entier ---	39-50
P,A	WO,A,95 06743 (UAB RESEARCH FOUNDATION) 9 Mars 1995 voir le document en entier ---	39-50
P,A	WO,A,95 23867 (RHONE-POULENC RORER) 8 Septembre 1995 voir le document en entier ---	39-50
T	JOURNAL OF VIROLOGY 70 (1). 1996. 559-565. ISSN: 0022-538X, Janvier 1996, XP002003262 YEH P ET AL: "Efficient dual transcomplementation of adenovirus E1 and E4 regions from a 293-derived cell line expressing a minimal E4 functional unit." voir le document en entier ---	1-50
T	J. VIROLOGY, vol. 70, no. 5, Mai 1996, AM.SOC.MICROBIOL.,WASHINGTON,US, pages 3227-3234, XP002003300 F.K. FERRARI ET AL.: "Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vector" voir le document en entier -----	1-50

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De: : Internationale No  
PCT/FR 96/00088

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9502697	26-01-95	FR-A- 2707664	20-01-95
		FR-A- 2718749	20-10-95
		AU-B- 7264694	13-02-95
		CA-A- 2144040	26-01-95
		CN-A- 1113390	13-12-95
		CZ-A- 9500639	15-11-95
		EP-A- 0667912	23-08-95
		FI-A- 951138	13-04-95
		JP-T- 8501703	27-02-96
		NO-A- 950939	10-03-95
		NZ-A- 269156	26-03-96
		PL-A- 308122	24-07-95
		ZA-A- 9405012	20-02-95
WO-A-9428152	08-12-94	FR-A- 2705686	02-12-94
		AU-B- 6850394	20-12-94
		CA-A- 2141212	08-12-94
		EP-A- 0652968	17-05-95
		JP-T- 7509616	26-10-95
FR-A-2707664	20-01-95	AU-B- 7264694	13-02-95
		CA-A- 2144040	26-01-95
		CN-A- 1113390	13-12-95
		CZ-A- 9500639	15-11-95
		EP-A- 0667912	23-08-95
		FI-A- 951138	13-04-95
		WO-A- 9502697	26-01-95
		JP-T- 8501703	27-02-96
		NO-A- 950939	10-03-95
		NZ-A- 269156	26-03-96
		PL-A- 308122	24-07-95
		ZA-A- 9405012	20-02-95
WO-A-9412649	09-06-94	AU-B- 5734994	22-06-94
		CA-A- 2145641	09-06-94
		EP-A- 0673431	27-09-95
WO-A-9520671	03-08-95	FR-A- 2716682	01-09-95
		AU-B- 1539595	15-08-95

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**Des : Internationale No  
PCT/FR 96/00088

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO-A-9506743	09-03-95	AU-B-	7565694	22-03-95
WO-A-9523867	08-09-95	FR-A-	2716893	08-09-95
		AU-B-	1852695	18-09-95

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**